

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen
Kinderspital

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Christoph Klein

Der Einfluss einer inhalativen Glutathiontherapie auf die Inflammation bei Patienten mit zystischer Fibrose

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Franziska Jonas

aus

Gräfelfing / Deutschland

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Gries

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Claus Neurohr

Prof. Dr. Bernhard Przybilla

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Andreas Hector

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 10. April 2013

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	11
1.1 Allgemeine Grundlagen zur zystischen Fibrose	11
1.2 Pathophysiologie der pulmonalen Inflammation	13
1.3 Progression der Lungenerkrankung bei CF	14
1.4 Oxidativer Stress und Redox Satus	16
1.5 Glutathion	18
1.6 Klinische Erfassung der Entzündungsprogression	21
1.7 Zusammenhang mit der Therapie bei der zystischen Fibrose	23
2. Zielsetzung	27
3. Probanden, Methoden und Material	29
3.1 Studiendesign und Probanden	29
3.2 Methoden	31
3.2.1 Erfassung der klinischen Parameter	31
3.2.2 Gewinnung, Aufbereitung und Lagerung der Proben	32
3.2.3 Zytospin	33
3.2.4 Durchflusszytometrie	34

3.2.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	37
3.2.6 Photometrie	39
3.2.7 Slot Blot	39
3.2.8 ELISA	40
3.3 Materialien	41
3.3.1 Geräte	41
3.3.2 Glas- und Plastikmaterial	41
3.3.3 Chemikalien und Puffer	42
3.3.4 Antikörper	43
3.3.4.1 Antikörper für FACS	43
3.3.4.2 Antikörper für ELISA	43
3.3.5 Statistik	44
4. Ergebnisse	45
4.1 Probandengruppen	45
4.2 Daten der Spirometrie	49
4.2.1 FEV ₁	49
4.2.2 Weitere spirometrische Parameter	50
4.3 Effekte der Glutathion-Inhalationstherapie auf Redoxparameter in Sputum und Blut	51
4.3.1 Glutathionkonzentrationen in Atemwegsflüssigkeit und Serum	51
4.3.2 Intrazelluläre Glutathionkonzentrationen	54
4.3.3 Proteincarbonylierung	55

4.4 Effekte der Glutathion-Inhalationstherapie auf die Inflammation	56
4.4.1 Zelldifferenzierung	56
4.4.2 Neutrophile Elastase	57
4.4.3 Proinflammatorische Marker in Sputumproben	57
4.5 Effekte der Glutathion-Inhalation auf die Neutrophilenaktivität	58
4.6 Unterschiede von Patienten mit CF und einer gesunden Vergleichsgruppe	59
5. Diskussion	63
5.1 Studie und Probanden	63
5.2 Effekte der inhalativen Glutathiontherapie auf die spirometrischen Parameter	65
5.3 Redoxparameter	66
5.3.1 Glutathion	67
5.3.2 Proteinoxidation	69
5.4 Zelluläre Differenzierung und Aktivität	69
5.4.1 Zelldifferenzierung	70
5.4.2 Aktivität und Funktion der neutrophilen Granzulozyten	70
5.4.3 Neutrophile Elastase	71
5.4.4 Zytokine und Chemokine	72
5.5 Vergleich der IGOR-Studie mit anderen Glutathion Studien	73
6. Zusammenfassung	77

7. Anhang	79
7.1 Abbildungsverzeichnis	79
7.2 Tabellenverzeichnis	80
7.3 Literaturverzeichnis	82
7.4 Verwendete Arbeitsprotokolle	87
7.4.1 Gewinnung und Verarbeitung der Sputumproben (V2, V3, V4, V5)	87
7.4.2 Aufbereitung der Blutproben (V2 und V5)	95
7.4.3 Durchflusszytometrie	97
7.4.4 Slot-Blot zur Messung von Protein-Carboxylierung	100
7.4.5 Methode zur Bestimmung der freien Elastase im Sputum	104
7.4.6 Bioplex	106
7.5 Danksagung	110

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AM	Alveolar Makrophagen
AP-1	Aktivatorprotein 1
ARDS	acute respiratory defency syndrome
ATP	Adenintriphosphat
BAL	bronchoalveoläre Lavage
B.cepacia	Burkholderia cepacia
BMI	body mass index
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
CD	cluster of differentiation
CF	zystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
Cl ⁻	Chlorid
cm	Zentimeter
CRP	C reaktives Protein
CXCR1	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 1
CYS	Cystein
D-PBS	Dulbecco's Phophate-Buffered-Saline
DCC	Differential Cell Count
DHR	Dihydrorhodamin
DTT	Dithiothreitol
ELF	epithelial linning fluid
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay

ENaC	epithelialer Natriumkanal
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii, lateinisch für “und andere“
FACS	fluorescens activated cell sorter
FSC	Forward Angle Light Scatter
FEV ₁	Forciert expiratorische Vitalkapazität in einer Sekunde
FVC	forcierte Vitalkapazität
g	Gram
GCL	Glutamylcysteinilgase
ggf.	gegebenenfalls
GGT	γ -Glutamyltransferase
GLU	Glutaminsäure
GLY	Glycin
GPx	Gluthationperoxidase
GS	Gluthathionsynthase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion Disulfid
GST	Glutathion-S-Transferase
GR	Glutathion-Reduktase
HPLC	high performance liquid chromatography
IGOR	Inhaled Glutathione for Oxidant Removal
IL	Interleukin
INF	Interferon
IPF	idiopathic pulmonary disease
kg	Kilogramm
l	Liter

MCB	Monochlorobimane
MEF	maximaler expiratorischer Fluss
mEq	milliequivalent
mg	Milligramm
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
NA	Natrium
NaCl	Kochsalz
NADP	Nikotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat
NADPH	reduziertes NADP
NE	neutrophile Elastase
NF- κB	nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
nm	Nanometer
PGE	Prostaglandin E
pnv	predicted normal value
sh.	siehe
SSC	Side Angle Light Scatter
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloroacetic acid
TrxSS	Thioredoxin
u.a.	unter anderem
V	Visite
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Grundlagen zur zystischen Fibrose

Die zystische Fibrose (CF), auch Mukoviszidose genannt, ist eine autosomal-rezessive Erbkrankheit. Hierbei ist durch einen genetischen Defekt am langen Arm des Chromosoms 7 die Funktion eines Proteins gestört. Dieses fungiert als Chloridkanal der Zellmembran („Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“ - CFTR) (1). Besonders zahlreich kommt das CFTR-Protein in Leberzellen, sekretorischen Zellen des Gastrointestinaltraktes und des Pankreas, sowie in Epithelzellen der Atemwege vor. Mittlerweile ist bekannt, dass dieser Kanal neben Chlorid (Cl^-)-Ionen auch für größere organische Anionen, wie z.B. das Antioxidans Glutathion durchlässig ist (2). Es kommen unterschiedliche Mutationen des CFTR-Gens vor, die sich in sechs Mutationsklassen einteilen lassen (3).

Mutationsklasse	Beschreibung des Defekts	Schwere des Defekts
I	keine oder verringerte Proteinsynthese, da Mutation richtiges Spleißen verhindert	schwer
II	Protein kann nicht im ER (endoplasmatisches Retikulum) reifen	schwer
III	Protein reift und erreicht Zielmembran, jedoch fehlende Funktion als Chloridkanal	schwer
IV	Protein in Zielmembran hat abnormale leitende Eigenschaften	leicht
V	Bildung weniger funktionsfähiger Proteine	leicht
VI	Verringerung der Halbwertszeit der Proteine	leicht

Tab.1.1 „Charakterisierung der CFTR-Mutationsformen“

Die Mutationsklasse ist, neben der individuellen genetischen Modulation der Immunantwort, eine der Haupteinflussgrößen auf die unterschiedlichen Ausprägungsformen des Krankheitsbildes. Einige häufiger auftretende Mutationsvarianten sind in Tab. 1.2 aufgeführt.

Mutation	Häufigkeit	Mutationsklassen
ΔF508	70-75 %	II
G542X	2,4%	I
G551D	1,6%	III
N2303K	1,3%	II
W1282X	1,2%	I

Tab.1.2 „Einteilung und Häufigkeit von CFTR-Mutationen“

Die Fehlfunktion des Chloridkanals bedingt osmotisch durch den verminderten Cl⁻-Ausstrom aus der Zelle einen ebenfalls verminderten Wasseraustritt. Das Sekret von Drüsen der Bronchen, des Dünndarms, der Geschlechtsorgane, der Bauchspeicheldrüse, der Leber und der Galle ist bei Betroffenen dadurch hoch viskös. In den einzelnen Organen hat dies je nach ihrer Funktion im Organismus verschiedene Auswirkungen. So führt eine veränderte Sekretion der Drüsen der Pankreasgänge häufig zu einer exokrinen Pankreasinsuffizienz, was eine Malnutrition zur Folge hat und durch die Substitution von Lipasen relativ gut behandelbar ist. Die Bildung eines zähflüssigen Sekrets in den Bronchen, das vom Flimmerepithel nicht ausreichend abtransportiert werden kann, führt zu Husten, Bronchiektasen, häufig wiederkehrenden Lungeninfekten, schweren Lungenentzündungen und zunehmender Lungeninsuffizienz (1). Die chronisch-progressive Entzündung der Atemwege und daraus folgende Lungenfibrose ist die Hauptursache für die Morbidität und Mortalität von CF-Patienten. Da bis jetzt keine kurative Behandlung (z.B. auf genetischer Ebene) möglich ist, soll therapeutisch die Symptomatik der Krankheit gelindert, die Progression verlangsamt und so die Lebenserwartung und -qualität verbessert werden. Dabei stützt sich die Behandlung auf vier Hauptpfeiler:

- (1) Verhinderung von Unter- und Mangelernährung und deren Folgen durch eine spezielle Diät sowie Substitution von Verdauungsenzymen.
- (2) Linderung der Lungenobstruktion durch physikalische, medikamentöse und physiotherapeutische Maßnahmen.
- (3) effektive Behandlung der Atemwegsinfekte mit Antibiotika.
- (4) Unterdrückung der überschießenden Entzündungsreaktion durch Modulation des Immunsystems.

Da in vielen Fällen die Lungenbeteiligung die Lebenserwartung der Patienten determiniert, ist als letzte Behandlungsalternative eine Lungentransplantation zu sehen. So ließ sich im Verlauf der letzten Jahrzehnte die Lebenserwartung von Patienten mit CF von 6 Monaten auf über 40 Jahre ausdehnen, was gleichzeitig der symptomatischen Behandlung zur Optimierung der Lebensqualität eine immer höhere Bedeutung zukommen lässt.

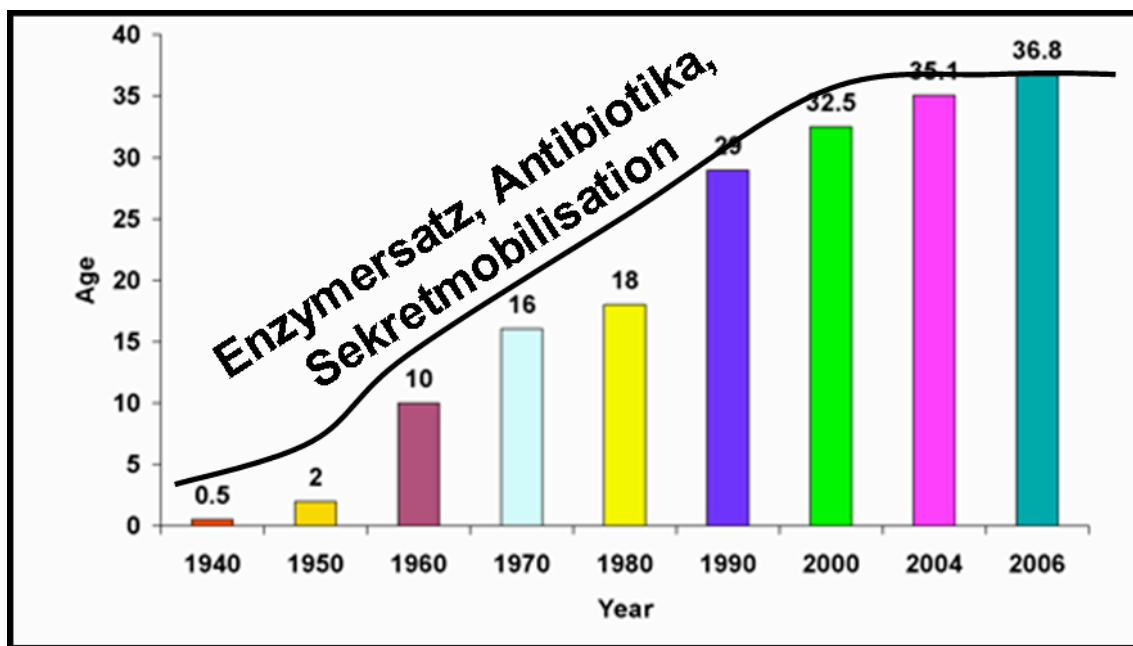


Abb.1.1 „Entwicklung der durchschnittlichen Lebenserwartung von CF-Patienten in westlichen Ländern“

1.2 Pathophysiologie der pulmonalen Inflammation

Es existieren unterschiedliche Hypothesen zur Pathophysiologie der CF und der Progression der Krankheit. Dabei stellen die einzelnen Modelle jeweils unterschiedliche

Funktionsstörungen auf Grundlage des genetischen Defekts in den Fokus. Die Pathophysiologie und Progression des gesamten Krankheitsbildes werden, besonders hinsichtlich der Lungenerkrankung im Rahmen der CF primär auf eine erhöhte Infektanfälligkeit zurückgeführt.

Ein vielfach angewandtes Modell sieht die erhöhte Mukusviskosität und die dadurch eingeschränkte Funktion des Flimmerepithels als Ursache einer mangelnden Bakterien clearance. Des Weiteren dient die hochvisköse Atemwegsflüssigkeit den Bakterien als geeigneter Nährboden, was die chronisch-progressive Infektion und Inflammation in den Atemwegen von CF-Patienten vorantreibt. Dabei wird die unphysiologische Molarität des die Atemwegsepithelien bedeckenden Flüssigkeitsfilms („epithelial lining fluid“ – ELF) für die mangelnde mechanische Funktionalität des Mukus verantwortlich gemacht. Dies beruht auf der Ionentransportstörung des CFTR-Kanals und resultiert in einer erhöhten Zähigkeit des Bronchialsekrets (4). Die Funktionsstörung des CFTR-Kanals äußert sich direkt durch verminderten Cl^- -Transport oder indirekt, durch begünstigen der ENaC (epithelialer Natriumkanal) -Funktion und der dadurch gesteigerten Na-Absorption (5).

Eine andere Hypothese stellt die gestörte Funktion der Epithelzellen und neutrophilen Granulozyten bei der Abwehr von Bakterien in den Mittelpunkt der Pathophysiologie und vor allem der Progression der Krankheit (6). Dabei wird der Chemokinrezeptor CXCR1 auf der Zelloberfläche proteolytisch gespalten, was eine deutlich herabgesetzte Phagozytoseaktivität zur Folge hat.

Eine weitere Hypothese macht den zu hohen Gehalt an Ceramiden für die meist letale Progression der Krankheit verantwortlich. Da Ceramide, neben ihrer strukturellen Funktion als Bausteine der Zellmembran auch als Signalmoleküle im Rahmen von Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptosevorgängen fungieren, und somit durch den erhöhten Gehalt die Infektanfälligkeit und Zellsterblichkeit des Lungenepithels gefördert wird (7); (8); (9).

1.3 Progression der Lungenerkrankung bei CF

Bei der Geburt ist die Lunge bei Patienten mit CF primär gesund. Erst die Sekretion eines unphysiologisch zähen Schleims des Bronchialepithels löst etwa ab dem 4. Lebensmonat die Atemwegsbeteiligung aus (10); (11). Der mangelnde Abtransport des Mukus aus den

Bronchen begünstigt die Ansiedlung von Bakterien in den Atemwegen, was eine entzündliche Reaktion des Organismus auslöst. Im Rahmen der Entzündungsreaktion kommt es zur Aktivierung des zellulären und humoralen Immunsystems.

In den Atemwegen von CF-Patienten dominieren neutrophile Granulozyten das Entzündungsgeschehen. Sie sezernieren eine große Menge an gewebsschädigenden und die Entzündung weiter unterstützenden Produkten. Da der zähe Mukus den Abtransport behindert, kommt es zu einer Anreicherung der Produkte der Entzündungsreaktion. Hieraus resultiert eine fortschreitende und sich selbst unterhaltende Entzündung und schließlich eine Lungenfibrose. Vermutlich kann es bei Patienten mit CF auch ohne primäre Infektion zu einer chronisch progressiven Atemwegsentzündung kommen, wodurch wiederum opportunistische Infektionen begünstigt werden (12); (13); (14). Ob eine bakterielle Infektion ursächlich oder symptomatisch für die Entzündung ist, lässt sich klinisch schwer bestimmen.

Die Schwere der Atemwegserkrankung bei CF ist nicht nur von der Art des genetischen Defektes des CFTR-Kanals, sondern auch von der individuellen Immunantwort abhängig. Physiologischer Weise folgt auf einen entzündlichen Stimulus die Antwort des Immunsystems durch entsprechend angepasste Aktivierung der körpereigenen Abwehr, sowie eine anschließende Begrenzung der Entzündungsreaktion. Beides ist bei Patienten mit CF gestört, was zu einer Chronifizierung der Entzündung führt. Bei Patienten mit CF wurde eine Erhöhung proinflammatorischer Zytokine, wie Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Interleukin 1 β (IL-1 β) und Interleukin 8 (IL-8) sowie eine Reduzierung von antiinflammatorischen und regulativen Markern, wie Interleukin 10 (IL-10), nachgewiesen.

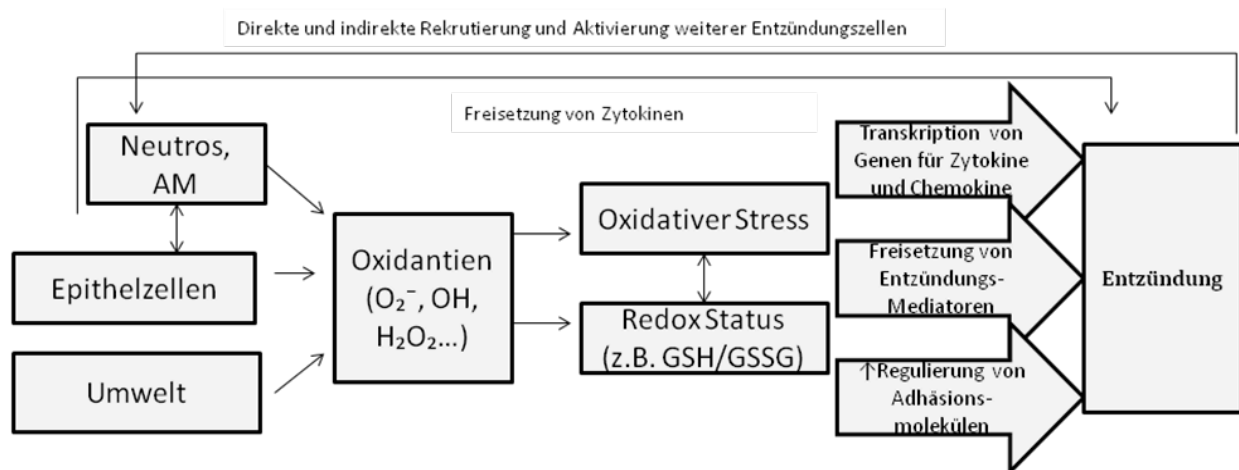
Bei Entzündungsvorgängen der Atemwege wird die unphysiologische Funktion des Immunsystems besonders deutlich. Einerseits ist das in der besonderen, funktionellen Beanspruchung und hohen Durchblutung des Atemsystems begründet. Des Weiteren ist die verminderte Abtransportfunktion des hochviskösen Mukus bei einer hohen Exposition gegenüber inhalierten und endogen produzierten Entzündungsauslösern besonders auffällig. Die unzureichende Immunantwort könnte sich auch auf eine Zelldysfunktion, der Atemwegsepithelzellen begründen. Dafür spricht, dass die Epithelzellen in der Lunge eine wichtige Rolle in der Regulation von Entzündungsvorgängen durch Freisetzung von Zyto- und Chemokinen spielen und so die übermäßige Immunantwort und die daraus folgende Gewebszerstörung unterstützen (15).

Auch die zirkulierenden neutrophilen Granulozyten von Patienten mit CF weisen eine abweichende genetische Regulation ihrer pro- und antiinflammatorischen Marker auf (16). Zusätzlich zeigen sie in der Lunge eine reduzierte antibakterielle Aktivität. Das lässt sich auf den hohen Gehalt an neutrophiler Elastase (NE), die verschiedene Komponenten des Immunsystems wie z.B. Immunglobuline, Immunkomplexe und Komplementfaktoren inaktivieren kann, zurückführen. Durch die Spaltung des CXCR1 Rezeptor für IL-8 durch die NE kommt es, trotz des hohen IL-8 Gehalts, nicht zu einer korrekten Abwehr von Mikroorganismen durch die neutrophilen Granulozyten (6). Dennoch kommt es zur weiteren Aktivierung von neutrophilen Granulozyten aus der Umgebung und so auch immer weiterer Ausschüttung von NE. Die Neutrophilen-dominierte Entzündung korreliert weiterhin mit einer Verminderung der biophysikalischen Aktivität der Oberfläche der kleineren Atemwege (Alveolen) benetzenden Surfactants. Das könnte in der Folge die Lungenfunktion verschlechtern und zu Zellschädigungen führen (17).

Die progressive Schädigung der Lunge wird also durch die gestörte Immunreaktion auf Infektionen und die erhöhte Entzündungsbereitschaft mit verminderter Regulation verursacht. Zusammenfassend ergibt sich ein infektiös- und entzündungsprophylaktischer Therapieansatz um möglichst lange eine adäquate Lungenfunktion aufrecht zu erhalten.

1.4 Oxidativer Stress und Redox Status

Bei der die CF-Lungenerkrankung kennzeichnenden Neutrophilen-dominierten Entzündung kommt es zur Freisetzung einer großen Zahl an freien Radikalen und zu einem Ungleichgewicht zwischen Antioxidantien und Oxidantien. Das führt wiederum zu oxidativem Stress und somit zur Schädigung von Proteinen (18). Bei besonders für oxidativen Stress empfindlichen Zellen, wie z.B. den Epithelzellen der Lunge, führt dies zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie des Aktivatorproteins 1 (AP-1) und des nukleären Faktors κB (NF- κB - nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells), was zu einer Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen führt (19). Dadurch werden die Entzündung und das schon bestehende Ungleichgewicht weiter verstärkt (sh. Abb. 1.1). So führt die chronische Entzündung der unteren Atemwegen von Patienten mit CF zur Zerstörung des Gewebes durch die zahlreich vorhandenen Oxidantien.



Abkürzungen: AM: Alveolar Makrophagen; Neutros: neutrophile Granulozyten

Abb.1.2 „Wechselwirkungen im Rahmen des Entzündungsgeschehens“

Der oxidative Stress hat weiterhin Einfluss auf das Redoxgleichgewicht einer Zelle. So ändert sich durch die ständige Oxidation der Redox Status des Atemwegsmileus. Dabei geht der für die Zellen wichtige reduzierende Charakter des Atemwegsmileus verloren und der elektrochemische Gradient, der den Elektronen- und somit den Energiefluss der Zelle gewährt, kann nicht aufrechterhalten werden (20). Gleichzeitig kann der Redox Status des Atemwegsmileus die Signalübermittlung, die Zellzyklusregulation, die Gentranskription, die Proteinsynthese und Enzymaktivierung beeinflussen, was zu einem veränderten Zellstoffwechsel, veränderten Entzündungsreaktion oder auch zu apoptotischen Vorgängen führen kann (21).

Wichtige Redoxpaare in der Biologie sind das Glutathion-System (GSSG/2GSH), das vor allem als Redox Puffer der Zelle funktioniert; das Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-System (NADP/NADPH), dessen Funktion in seiner Rolle als wichtigster Elektronendonator des Zellstoffwechsels liegt und das Thioredoxin-System (TrxSS/Trx(SH)²), ein ebenfalls wichtiges Thiolsystem der Zelle (20).

1.5 Glutathion

Glutathion ist ein in fast allen Zellen des Organismus in hoher Konzentration enthaltenes, Tripeptid aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin.

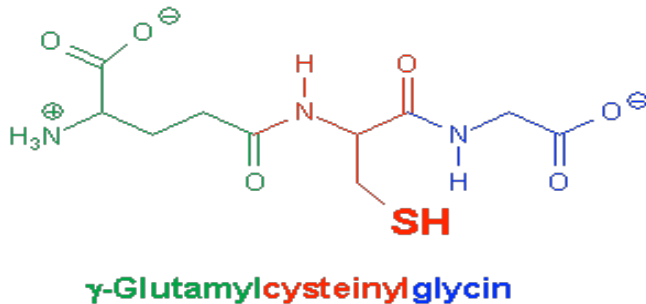
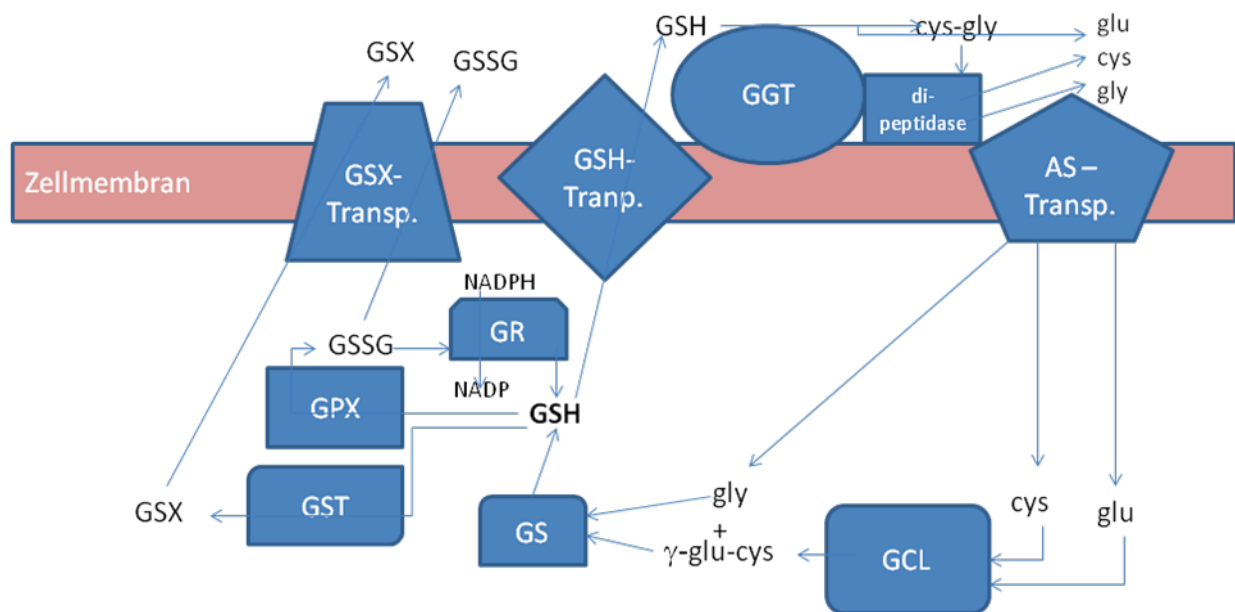


Abb.1.3 „Strukturformel von Glutathion“

Es gehört zu den wichtigsten Antioxidantien des Körpers. Dabei wird es, anders als typische Proteine, nicht an den Ribosomen, sondern im Zytosol unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) hergestellt. Seiner Aufgabe als Antioxidans zum Schutz von Proteinen, Membranlipiden und anderen Makromolekülen der Zelle vor freien Radikalen kommt es auf zwei Wegen nach. Einmal, indem es den Enzymen Glutathionperoxidase (GPx) und Glutathion-S-Transferase (GST) als Substrat dient. Zusätzlich hat reduziertes Glutathion (GSH) auch eine direkt antioxidative Wirkung, indem es z.B. von freien Radikalen oxidiert wird, wobei sich zwei GSH-Moleküle unter Abspaltung des Wasserstoffs ihrer Thiolverbindung zu einem Glutathion-Disulfid (GSSG) verbinden. Dadurch schützt es andere Moleküle vor der ungewollten Oxidation bei oxidativem Stress. Im Anschluss kann durch das Enzym Glutathion-Reduktase (GR) unter NADPH-Verbrauch wieder das reduzierte Glutathion hergestellt werden (22). Zusammenfassend ist dieser Metabolismus des Glutathions in Abb. 1.4 dargestellt.



Abkürzungen: GPX – Glutathionperoxidase; GST – Glutathion-S-Transferase; GS – Glutathionsynthase; GR – Glutathionreduktase; GSSG – Glutathiondisulfid; NADP – Nikotinamadenindiphosphat; NADPH – reduziertes Nikotinamadenindiphosphat; GSH – Glutathion; GS – Glutathionsynthase; ; GR – Glutathionreduktase; GGT – γ -Glutamyltransferase; GCL - Glutamylcysteinyligase ;AS – Aminosäure; glu – Glutamin; cys – Cystein; gly – Glycin; Transp. – Transporter

Abb. 1.4 „Überblick über den Glutathionmetabolismus“

Glutathion liegt *in vivo* zu 90% in reduzierter Form vor. Dementsprechend ist allgemein und auch im Rahmen dieser Arbeit bei „Glutathion“ von reduziertem Glutathion die Rede. Die wichtigste Quelle von reduziertem Glutathion ist die intrazelluläre *de novo*-Synthese aus den Bausteinen Glutaminsäure, Glycin und Cystein durch die beiden Enzyme Glutamylcysteinyligase (GCL) und Glutathionsynthase (GS), wobei ersteres Enzym die Syntheserate reguliert (23). Bei den für die Biosynthese von Glutathion verantwortlichen Enzymen führt ein erhöhter oxidativer Stress zu einer vermehrten Bildungsrate, was den Glutathion-Gehalt im Falle einer Entzündung und dem daraus entstehenden Bedarf an Antioxidantien, erhöht. Die Produktion von Glutathion findet intrazellulär statt und es lässt sich extrazellulär nur in geringem Maß nachweisen. Anders verhält es sich im ELF, der beim Gesunden eine hohe Konzentration an reduziertem Glutathion aufweist. So ist der Glutathion-

Gehalt des ELF etwa 100-mal höher als des Plasmas (24). Bei einem erhöhten intrazellulären Gehalt an v.a. reduziertem Glutathion und des Enzyms GCL ist gleichzeitig der Gehalt an Glutathion-spaltender γ -Glutamyltransferase (GGT) in der Lunge erniedrigt. Das lässt sich durch den großen Bedarf an Antioxidantien in der Lunge erklären. Dieser Bedarf besteht aufgrund der hohen Belastung des Atmungsorgans mit eingeatmeten oder bei der Abwehr von Fremdkörpern entstandenen Oxidantien.

Das Verhältnis von oxidiertem und reduziertem Glutathion ist ausschlaggebend für den Redox Status einer Zelle und beeinflusst die Signalübermittlung und Zellproliferation. Innerhalb des Immunsystems wird dadurch die Transkription von Genen, die für proinflammatorische Zytokine kodieren, reguliert und die Funktion von Immunzellen moduliert. In der Lunge von Gesunden übernimmt das reduzierte Glutathion im ELF die antioxidativen Aufgaben und trägt zur Erhaltung einer physiologischen Lungenfunktion bei. Es reguliert über die Apoptosevorgänge der Zellen und erhält als Antioxidans den antiproteolytischen Schutz der Lunge aufrecht. Zusätzlich verringert es die Viskosität des Mukus durch Aufspaltung der Disulfidbrücken und ist am Umbau der extrazellulären Matrix beteiligt.

Der ELF bei Patienten mit CF weist einen erniedrigten Gehalt an reduziertem Glutathion auf. Dies betrifft auch Patienten mit anderen, ebenfalls mit einer Entzündung der Atemwege assoziierten Erkrankungen wie ARDS („acute respiratory defency syndrome“), IPF („idiopathic pulmonary desease“) und Patienten mit einem Lungentransplantat im Rahmen einer „graft versus host“-Reaktion (25).

Im Gegensatz zu den Werten der durch bronchoalveoläre Lavage gewonnenen ELF-Proben ist der Glutathion-Gehalt im Sputum bei CF-Patienten deutlich höher als bei Gesunden (26). Weitere Studien zeigen, dass auch der Glutathion-Gehalt im Sputum von Patienten mit COPD, was auch mit Neutrophilen-domininierten Entzündungsvorgängen assoziiert ist, höher ist als bei Gesunden (27).

1.6 Klinische Erfassung der Entzündungsprogression

Eine zuverlässige und aussagekräftige Beurteilung der Atemwege der Patienten ist unerlässlich, um eine korrekte Einschätzung des aktuellen Gesundheitszustands eines CF-Patienten und den zu erwartenden Verlauf zu erlauben. Auch für die Beurteilung der Wirksamkeit neuer Therapien ist dies notwendig. Hier bieten sich neben der regelmäßige Kontrolle der Lungenfunktion am Spirometer weitere diagnostische Untersuchungen an. Die mikrobiologische Untersuchung von Sputum und die Ermittlung entzündungsrelevanter Laborparameter mit Hilfe einer Blutuntersuchung erscheinen sinnvoll. Weitere bildgebende Diagnostik der Lunge mittels einer Röntgenuntersuchung oder einer Computertomographie an.

Bei der Ermittlung von allgemeinen Entzündungsparametern im peripher-venösem Blut, wie Leukozytenzahl und CRP (C-reaktives Protein) -Level fällt auf, dass diese nicht zwangsläufig mit dem klinischen Bild der CF korrelieren. Das lässt sich dadurch begründen, dass die Pathologie und Progression der Lungenerkrankung bei CF von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst werden. Daher ist es umso wichtiger, zugleich auch auf Parameter zurückzugreifen, die den Krankheitsprozess speziell in den Atemwegen selbst widerspiegeln, um den Effekt einer antiinfektiösen oder antiinflammatorischen Therapie verlässlicher nachzuweisen. Zur Darstellung der Progression der Lungenentzündung und somit auch die der Krankheit an sich, kommen zahlreiche Biomarker und entsprechende Methoden in Frage. Von Mayer-Hamblett und Kollegen wurden einige Kernanforderungen formuliert, mit Hilfe derer die klinische und biologische Relevanz, die Reproduzierbarkeit, die möglichst genaue Spezifität und Sensitivität und auch die Anwendbarkeit der einzelnen Marker gewährleistet werden sollen (28). Eine Auflistung unterschiedlicher Biomarker die Hinweise auf den Verlauf der Entzündung bei CF v.a. der unteren Atemwege geben, findet sich in Tabelle 1.3.

Entzündungszellen	Neutrophile, Makrophagen, Lymphozyten Epithelzellen
Zytokine	IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ
Zytokin-Antagonisten	TNF-Rezeptor II, IL-1 Rezeptor Antagonist
Chemokine	IL-8, Leukotrien B
Chemokinrezeptoren	CXCRs, CCRs
von Entzündungszellen sezernierte Proteasen	Neutrophile Elastase, Proteinase 3, Cathepsin G
Antiproteasen	α 1-Antitrypsin, SLPI
Marker von oxidativem Stress	GSH/GSSG-Verhältniss, Glutathion-Gehalt, Proteinoxidation
Antioxidantien	Superoxid Dismutase, Glutathion, Katalase
Adhäsionsmoleküle	Lösliche intrazelluläre Adhäsionsmoleküle

Tab. 1.3 „Marker zur Beurteilung der entzündlichen Vorgänge im Rahmen der Lungenerkrankung bei CF“

Je nachdem, ob routinemäßig der momentane Gesundheitszustand des Patienten oder etwa der Effekt einer bestimmten Therapie kontrolliert werden soll, sind entsprechende Untersuchungen durchzuführen. So ist z.B. bei einer Antibiotikatherapie die genaue mikrobiologische Untersuchung des Sputums auf die zu bekämpfenden Bakterien besonders sinnvoll. Zur Beurteilung einer antiinflammatorischen Behandlung dagegen sollten Entzündungsmarker entsprechend der Ansatzpunkte der jeweiligen Therapie bestimmt werden. Besonders geeignet erscheinen hier die in Folge der chronischen Entzündung in hoher Zahl vorhandenen Marker, die proinflammatorische oder oxidative Prozesse widerspiegeln. Im Rahmen größerer Studien müssen weiterhin die herkömmlichen klinischen Parameter ermittelt und die üblichen labortechnischen Nachweisverfahren (z.B. Blutbild und Bakterienkultur) durchgeführt werden. Neben der Beurteilung des Erfolgs soll das auch die Abschätzung einer möglichen Schädlichkeit der Therapie erlauben. Bei der Probengewinnung zur Ermittlung der jeweiligen Entzündungsparameter stehen neben den invasiven Methoden der bronchoalveolären Lavage immer häufiger nicht-invasive Methoden, aufgrund der einfacheren und schonenderen Durchführbarkeit, zur Probengewinnung im Mittelpunkt.

Dabei eignet sich besonders vom Patienten spontan produziertes oder induziertes Sputum zur Untersuchung auf Entzündungsmarker. Dabei lassen sich durch die Methode der Sputuminduktion mittels Inhalation einer hypertonen Kochsalzlösung bereits von Kindern ab sechs Jahren gefahrlos Sputumproben gewinnen, die sich sowohl zur Untersuchung auf eine Entzündung als auch auf eventuelle Infektionen eignen (10); (29). Des Weiteren sind nicht-invasive Methoden zur Probengewinnung und Ermittlung von Entzündungsparametern, wie z.B. die Untersuchung exhalierter Luft auch bei gesunden Kontrollprobanden durchführbar.

In klinischen Studien konnte bereits die negative Korrelation der Einsekundenkapazität (FEV₁) mit einigen Parametern in Sputumproben, wie z.B. der neutrophilen Elastase (NE), IL-8 und der Anzahl an neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden (30). Dennoch muss für viele weitere, bisher gewonnene und v.a. für zukünftige Ergebnisse eine sichere positive oder negative Korrelation mit den klinischen Daten belegt werden. Nur dann lassen sie sich als aussagekräftige Parameter für die Beurteilung des Gesundheitszustandes des Patienten betrachten.

1.7 Zusammenhang mit der Therapie bei zystischer Fibrose

Kennzeichnend für chronisch-entzündliche Lungenerkrankungen wie die CF sind die ständig wiederkehrenden Entzündungen. Dabei kommt es zu einer übermäßigen Ausschüttung von hoch reaktiven Oxidantien durch Neutrophile und andere Entzündungszellen. Die zusätzliche Inhalation weiterer Oxidantien führt im Laufe der Erkrankung zu einer wachsenden oxidativen Überlastung. Dies macht sich in einem vermehrten Verbrauch und dem daraus folgenden Mangel an Antioxidantien, wie reduziertem Glutathion, bemerkbar (31). Das Glutathion kann somit seiner Aufgabe also Mukolytikum nicht mehr nachkommen.

Eine Verminderung des Glutathion-Gehalts im ELF könnte in der gestörten Funktion des CFTR-Kanal bei CF-Patienten liegen, da er auch als Kanal für größere anionische Moleküle, wie Glutathion dient und die Funktionsstörung auch den extrazellulären Transport von reduziertem Glutathion vermindern könnte. Durch das zahlreiche Vorkommen dieses Kanals in der Plasmamembran von Atemwegsepithelzellen würde der Glutathion-Gehalt hier dann besonders ungünstig beeinflusst werden. Dafür sprechen die Ergebnisse von *in vitro* Studien, die die Regulation des Glutathion-Ausstroms durch das CFTR Protein belegen und eine *in*

vivo Studie an *Cftr*-knock-out Mäusen, die einen erniedrigten Glutathion-Gehalt im ELF aufwiesen (32); (33). Der bestehende Glutathion-Mangel in der ELF macht die Zellen der unteren Atemwege, wie Epithel- und Endothelzellen und Alveolarmakrophagen, anfälliger gegenüber oxidativen Stress. Dies führt zur vermehrten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, einer erhöhten Permeabilität von Epithelzellen und schließlich zur Apoptose. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass das durch den oxidativen Stress veränderte GSH/GSSG Verhältnis in Endothelzellen der Lunge zur Ausbildung von Adhäsionsmolekülen und somit zu einer vermehrten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten führt (34). Diese Vorgänge verstärken und unterhalten die entzündlichen Vorgänge weiter und bestimmen die Pathophysiologie der Lungenerkrankung bei CF. Gleichzeitig führt der ständige Verbrauch des noch vorhandenen reduzierten Glutathions zur Veränderung des Verhältnisses von oxidiertem und reduziertem Glutathion, was intrazellulär zu einem veränderten Redox Status führt und somit die Entzündung durch proinflammatorische Signalwege weiter verstärkt (25). Aufgrund der mangelnden Permeabilität ist eine Supplementation von intrazellulärem Glutathion kaum möglich und aufgrund der oben beschriebenen Vorgänge bei bestehendem CFTR-Defekt auch nicht erfolgversprechend. Es ist also anzunehmen, dass eine direkte Erhöhung des extrazellulären Glutathion-Gehalts, durch Ausgleich des bestehenden Ungleichgewichts und des hohen Verbrauchs eine günstige, antiinflammatorische Wirkung hat. Dies ist mittels Inhalation auch bei der relativ geringen Halbwertszeit des Glutathions möglich, wie Studien, die die Anreicherung von Glutathion in der ELF nach Inhalation belegen, nachweisen (35). Dadurch soll die Lungenfunktion betroffener Patienten positiv beeinflusst werden. Eine inhalative Glutathion-Supplementation wurde in einigen kurzzeitigen Studien mit kleiner Probandenzahl erprobt und wies dort einen neben dem Anstieg des ELF-Gehalts an reduziertem und oxidiertem Glutathion auch gute Verträglichkeit auf. Gleichzeitig kam es zu einer Verbesserung der Lungenfunktion (36); (37). Das zeigen auch weitere Untersuchungen in Rahmen einer Studie von Bishop et al., bei der nach Glutathion-Inhalation eine Verbesserung der Einsekundenkapazität, des allgemeinen Befindens der Patienten und weiterer klinisch relevanter Parameter verzeichnet werden konnte (38).

Auch die orale Supplementation mit N-acetylsteine, einer Prodrug von Glutathion, scheint zu einer Modulation der Entzündungsvorgänge und einer günstigen Beeinflussung des Redoxungleichgewichts zu führen. Das unterstützt auch die Studie von Tirouvanziam et al., bei der die orale Gabe neben einem Anstieg des Glutathion-Gehalts der im Blut

zirkulierenden neutrophilen Granulozyten, auch den Rückgang der Neutrophilenanzahl und der Aktivität der neutrophilen Elastase im Sputum zur Folge hatte (39).

Folglich erscheinen weitere, größer angelegte Untersuchungen sinnvoll. Hier soll eine längere Anwendungsdauer die bessere Beurteilung von inhaliertem Glutathion als antiinflammatorische und gleichzeitig Lungenfunktions-verbesserndes Therapeutikum bei CF erlauben.

2. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine inhalative Glutathiontherapie positiven Einfluss auf die pulmonale Inflammation bei Patienten mit CF hat.

Um die Hypothese zu überprüfen wurden die im Rahmen der IGOR (Inhaled Glutathione for Oxidant Removal) –Studie erhobenen Daten ausgewertet und die gesammelten Sputum- und Blutproben auf proinflammatorische Marker untersucht. Bei der IGOR-Studie handelte es sich um eine deutschlandweite, multizentrische, randomisierte und placebokontrollierte Doppelblindstudie zur Untersuchung der Sicherheit und Wirksamkeit einer 24-wöchigen, inhalativen Glutathiontherapie bei CF-Patienten. Im Laufe der Studie wurden bei regelmäßigen Visiten die Sputum- und Blutproben gesammelt und anschließend auf Entzündungs- und weitere, für die CF typische Marker untersucht. Die so erhobenen Daten wurden miteinander und mit weiteren klinischen Parametern verglichen. So sollte eine eventuelle Veränderung im Studienverlauf und auch eine unterschiedliche Entwicklung der Verum- und der Placebodatens nachgewiesen werden.

Wir stellten folgende Fragen:

- Wie verändert sich der Gehalt an Glutathion im Sputum der Probanden unter einer Langzeittherapie mit inhalativem Glutathion?
- Lässt sich durch die inhalative Therapie eine Änderung der Gesamtzellzahl, der Differenzialzellzahlen und der Viabilität der Zellen in Sputum nachweisen?
- Hat inhalatives Glutathion einen Effekt auf den Gehalt an neutrophiler Elastase im Sputum?
- Beeinflusst Glutathion die Konzentration an proinflammatorischen oder regulatorischen Zytokinen?
- Hat Glutathion einen Einfluss auf die Aktivität von neutrophilen Granulozyten?
- Tritt eine klinische Verbesserung der Patienten (z.B. Lungenfunktion, klinische Entzündungsparameter) durch die Therapie ein?

3. Probanden, Methoden und Material

3.1 Studiendesign und Probanden

Bei der Studie handelte es sich um eine multizentrische, randomisierte, placebokontrollierte Doppelblindstudie zur Untersuchung der Sicherheit und Wirksamkeit einer 24-wöchigen inhalativen Glutathiontherapie bei CF-Patienten.

Über 24 Woche erfolgte zweimal täglich die Inhalation von 646 mg, in 4 ml sterilem Wasser gelöstem GSH-Na. Als Placebo dienten 4ml einer 0,9 %-igen Kochsalzlösung.

Der Fokus der Studie lag dabei auf der prozentualen Verbesserung der FEV₁, der mit Glutathion inhalierenden Gruppe von V2 bis V5 verglichen mit der Placebogruppe.

Darüber hinaus erfolgte die Untersuchung von inflammatorischen Markern, Gehalt von Glutathion und freier Elastase im induzierten Sputum, Vorkommen von pulmonalen Exazerbationen, Entwicklung von Größe und Gewicht der Probanden, Veränderung der Lebensqualität der Probanden und die Kontrolle der Sicherheit und Verträglichkeit der Behandlung mit Glutathion.

Nachfolgend findet sich eine Auflistung der Ein- und Ausschlusskriterien der Studie, anhand derer die Auswahl der Patienten stattfand.

Einschlusskriterien für Probanden waren:

- ein Alter von mindestens acht Jahren.
- die gesicherte Diagnose der zystischen Fibrose durch Nachweis des genetischen Defekts auf beiden Allelen und / oder eines positiven Schweißtests (> 60mEq/l) anhand der Pilocarpin Iontophorese.
- Um die Sicherheit der Inhalationstherapie zu gewährleisten und gleichzeitig einen positiven Effekt der Behandlung innerhalb von 24 Wochen zu ermöglichen war eine FEV₁ zwischen 40% und 90 % Voraussetzung für die Behandlung.
- Die Durchführbarkeit der Spirometrie sowie die Einhaltung des Studienprotokolls durch den Patienten.

- Um die Aussagekraft der gewonnenen Daten zu optimieren, muss der Patient klinisch stabil sein und keine Änderung der medikamentösen Behandlung für die Studiendauer geplant sein.
- Zustimmung des Patienten und ggf. seines Vormunds

Ausschlusskriterien für die Studie waren:

- Studienrelevante Allergien
- Medikation mit oralen oder inhalativen, thiolhaltigen Präparaten
- Medikamenten-, Alkohol- oder Drogenmissbrauch
- Nachweis von *B. cepacia* im Rahmen der mikrobiologischen Voruntersuchung
- Zeitnahe Beginn einer neuen oder periodisch chronischen Medikation
- Teilnahme an einer anderen Studie vor nicht länger als einem Monat bzw. der 6-fachen Halbwertszeit des angewandten Präparats (ausschlaggebend ist der längere Zeitraum)
- Schwangerschaft, Stillen oder keine verhütenden Maßnahmen bei sexuell aktiven, fruchtbaren Frauen

Diese Kriterien kamen zum Schutz der Patienten und gleichzeitig zur Sicherung der Aussagekraft der gewonnenen Daten zum Einsatz. Da die gesamten Befunde, genauso wie andere vorliegende, ebenfalls von der Studie ausschließende, klinisch relevante Erkrankungen den Patienten gefährden, oder die erhobenen Daten verfälschen könnten.

Im Laufe der Behandlung waren für jeden Probanden fünf Visiten vorgesehen. Bei der ersten Visite erfolgte das Screening, also die Entscheidung ob der Patient die Einschlusskriterien der Studie erfüllt und keine Ausschlusskriterien vorliegen, eine genaue körperliche und medizinische Untersuchung sowie die Aufklärung des Patienten. Bei der zweiten Visite, zwei Wochen später erfolgte die Randomisierung, also die zufällige Zuteilung des Medikaments oder des Placebos und dessen Aushändigung für den Zeitraum bis zur nächsten Visite zusammen mit dem Inhalationsgerät. Darüber hinaus wurden die für die Studie vorgesehenen Daten und Werte durch klinische Untersuchung des Patienten bzw. anhand der

abgegebenen Proben ermittelt. Bei der dritten (etwa 1 Monat später) und vierten Visite (etwa 2 Monate nach Visite Nr. 3) erfolgte wiederum die Erhebung der vorgesehenen Daten und Werten, die Rückgabe der verbrauchten Medikamente, die Aushändigung neuer Medikamente und eine Kontrolle des Inhalationsgerätes. Die fünfte Visite (wiederum 3 Monate später) war gleichzeitig das Ende der Behandlung und es erfolgte neben der Erhebung der Daten und Werte eine abschließende Untersuchung, sowie die Rückgabe der Geräte an die Klinik. Zwischen den einzelnen Terminen wurde der Proband wöchentlich telefonisch kontaktiert und zusätzlich am Tag vor einer Visite an diese erinnert.

Man hoffte anhand dieser Studie die vielen Theorien bezüglich einer Inhalationstherapie mit Glutathion untersuchen zu können, wissenschaftliche Beweise für den Nutzen der Behandlung zu finden und eine klare Hypothese über die mögliche Wirkungsweise von Glutathion zu entwickeln, um bei zukünftigen Auswertungen gezielter vorgehen zu können.

Für die vorliegende Doktorarbeit erfolgte zusätzlich die Untersuchung von Blut, Sputum und Einsekundenkapazität von gesunden Kontrollprobanden, um eine weitere Vergleichsgröße bei der Auswertung von Daten und Entzündungsparametern zu haben.

3.2 Methoden

3.2.1 Erfassung der klinischen Parameter

Mit Hilfe der Spirometrie wurden unter anderem die Einsekundenkapazität (FEV_1), die forcierte Vitalkapazität (FVC) und die expiratorische Atemstärke (wie z.B. MEF-maximaler expiratorischer Fluss) gemessen. Außerdem erfolgte die Dokumentation von Größe und Gewicht des Patienten und Untersuchung auf eine akute pulmonale Exazerbation mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens und eines Studenttagebuchs, in dem die Probanden selbstständig die Inhalationstherapie und ihren Einfluss auf ihre körperlichen Verfassung und den Gesundheitszustandes beurteilen und dokumentieren sollten. Dazu sollten die Peak-flow Werte, die Inhalationsdauer und (unerwünschte) Ereignisse wie z.B. Übelkeit, Kopfschmerzen festgehalten werden.

In den Routinelabors der jeweiligen Kliniken wurden die Blutwerte (v.a. Entzündungsmarker) ermittelt.

3.2.2 Gewinnung, Aufbereitung und Lagerung der Proben (sh. 7.4.1 und 7.4.2)

Die Induktion des Sputums erfolgte durch 15 minütiges Inhalieren von 5ml einer 5,85%igen NaCl-Lösung über einen Pari Boy SX Kompressor und einen LC Star / Sprint Vernebler. Vor dem Aushusten des Sputums, nach 5, 10 und 15 Minuten, sollte der Patient ausspucken und den Mund ausspülen, damit die Probe nicht durch Speichel kontaminiert wird. Die nach 5 Minuten abgegebene Sputumprobe wurde für mikrobiologische Untersuchungen verwendet, die beiden anderen Sputumproben wurden gepoolt und anschließend zur Aufbereitung in das angeschlossene Labor gebracht. Bei der zweiten und fünften Visite wurde dem Probanden zusätzlich Blut abgenommen und ebenfalls in das angeschlossene Labor gebracht.

Die Aufbereitung erfolgte nach dem Protokoll für Sputum- bzw. Blutaufbereitung vom 11.10.2007. Das Sputum wurde gewogen, anschließend wurden acht Portionen mit je ca. 0,2g weiterverarbeitet. Die einzelnen Portionen wurden mit der neunfachen Menge Dulbecco's Phosphate-Buffered-Saline(D-PBS) verdünnt, durch eine weitleumige Spritze (18 Gauge Kanüle auf 2 ml Spritze) homogenisiert und gepoolt. Anschließend wurde die Probe zur Reinigung durch Zellsiebe der Körnung 100µm und 40µm laufen gelassen und dann in 1ml Portionen bei 300*g für 10 min zentrifugiert. Die erhaltenen Zellpellets wurden nach Abpipettieren des Überstandes mit 200µl D-PBS resuspendiert. Um eine korrekte Verdünnung der Zellsuspension zur Weiterverarbeitung für die einzelnen Methoden zu ermöglichen erfolgte noch eine Gesamtzellzählung unter dem Lichtmikroskop mit Hilfe der Neumeyer Zählkammer.

Der vorher gewonnene Überstand wurde gepoolt und anschließend bei 10000*g für 5 Minuten zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde nun bis zur Messung bei -70 °C gelagert.

Anders als im Rahmen anderer Studien angewandter Protokolle wird hier auf die Verwendung von Dithiothreitol (DTT) zur Aufbereitung der Sputumproben zu Gunsten der oben erwähnten mechanischen Aufbereitung mit D-PBS verzichtet. So wird eine störende Wechselwirkung von DTT und Glutathion vermieden und es ist eine zutreffende Bewertung der Redox-abhängigen Entzündungsvorgänge im Rahmen der CF möglich. Bei einem Vergleich der unterschiedlichen Aufbereitungsmethoden ergaben sich hinsichtlich unterschiedlicher Aspekte (wie z.B. die Zellzahl, Messung von inflammatorischen Mediatoren) außerdem keine Nachteile bei der mechanischen Sputumaufbereitung gegenüber DTT (40).

Die Blutproben wurde zur Isolation der Zellen 10 Minuten bei 300*g zentrifugiert und die Zellen wurden anschließend mit der gleichen Menge an D-PBS resuspendiert. Analog zum Überstand der Sputum-Zellsuspension, wurde auch hier der Überstand noch einmal bei 10000*g für fünf Minuten zentrifugiert und der dann daraus erhaltene Überstand bei -70 °C eingefroren.

3.2.3 Zytospin (sh.7.4.1)

Vor Herstellung der Zytospin-Präparate wurden eine Gesamtzellzählung und die Bestimmung des prozentualen Anteils an abgestorbenen Zellen anhand der Trypanblau-Exklusionsmethode durchgeführt. Anschließend erfolgte die Verdünnung der Zellsuspension auf 100.000 Zellen / ml. Von den sechs hergestellten Präparaten wurden je zwei ungefärbt belassen, zwei lediglich mit Methanol fixiert und zwei Präparate anhand des Protokolls von In Vitro Diagnostikum nach May-Grünwalds – Giemsa (Pappenheim Färbung) angefärbt. Das Färberesultat ist in Tab.3.1 aufgeführt. Bei der Differentialzellzählung war besonders der prozentuale und totale Anteil der neutrophilen Granulozyten von Interesse.

Zelltyp	Pappenheim Färbung
Kerne	Purpur bis Violett
Lymphozyten	Plasma blau
Monozyten	Plasma taubenblau
Neutrophile Granulozyten	Granula hellviolett
Eosinophile Granulozyten	Granula ziegelrot bis dunkelviolett
Basophile Granulozyten	Granula dunkelviolett bis schwarz
Thrombozyten	Dunkelviolett
Erythrozyten	Rötlich

Tab. 3.1 „Resultat nach Färbung und Anwendung von Phosphat-Puffer nach Weise (pH = 6,8)

3.2.4 Durchflusszytometrie (sh.7.4.3)

Die Durchflusszytometrie findet Anwendung zur quantitativen Zellanalyse sowie zur Aufteilung von Zellpopulationen anhand gewisser physikalischer Parameter wie Granulationsgrad, Membranstruktur oder Querschnittsfläche. Diese Einteilung in Gruppen mit entsprechenden physikalischen Eigenschaften stellt sich wie in Abb. 3.1 gezeigt dar und erlaubt somit durch Eingrenzen (Gating) einer Wolke die individuelle Analyse bestimmter Zellsubpopulationen wie z.B. neutrophile Granulozyten.

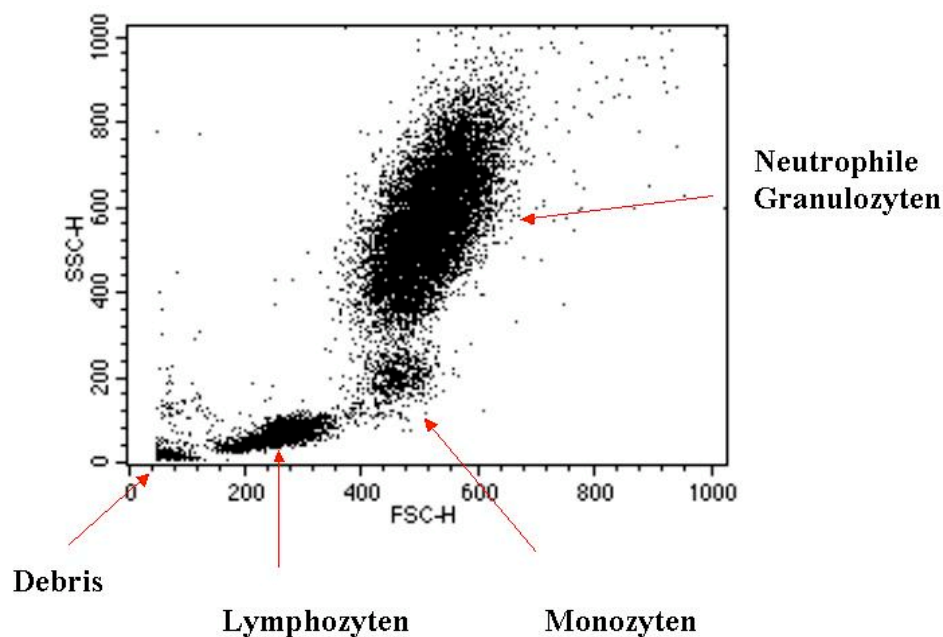


Abb. 3.1 „graphische Darstellung der FACS Messung“

Darüber hinaus können zelluläre Oberflächenproteine und intrazelluläre Strukturen durch direkte oder indirekte Markierung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern bestimmt werden. Die eingesetzten Geräte werden als FACS („fluorescence activated cell sorter“) bezeichnet. Bei der Durchflusszytometrie unterscheidet man drei, von einander abhängige Phasen:

- a) Fluoreszenzfärbung
- b) Messung
- c) Auswertung

a) Fluoreszenzfärbung

Hier lassen sich bei der direkten Färbung die Oberflächen Antigene direkt mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper konjugieren. Bei der indirekten Färbemethode bindet zunächst ein primärer Antikörper an das Antigen, bevor ein weiterer, sekundärer Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper an den Antigen-Antikörperkomplex bindet. Neben der extrazellulären Oberflächenmarkierung ist auch die Anfärbung intrazellulärer Proteine möglich. Die durch Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorchrom) fluoreszierenden Antikörper weisen dann bei Anregung durch einen Argonlaser ein detektierbares Emissionsspektrum auf. Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Fluorochrome sind in Tab.3.2 aufgeführt.

Fluorchrom	Max. Anregung	Emission	Farbe
FITC	488 nm	520 nm	Grün
PE	488 nm	575 nm	Rot – Orange
PerCP	488 nm	675 nm	Rot

Tab. 3.2 „Überblick über die bei der Fluoreszenzfärbung verwendete Fluorochrome“

Die verwendeten direkten und indirekten Antikörper zur Markierung der Zellen finden sich in Tab.3.3. Die Anfärbung der verdünnten Zellsuspension erfolgte nach dem unter 7.4.3 aufgeführten Färbeprotokoll. Prinzipiell erfolgte die extrazelluläre Markierung der Zellen durch Zugabe des jeweiligen Antikörpers (bei indirekter Anfärbung zwei entsprechender Antikörper) zu einer auf 1.000.000 Zellen/ml verdünnten Zellsuspension und Inkubation für eine vom Antikörper abhängigen Zeit (15-60 min). Anschließend erfolgte die Fixierung mittels Formaldehyd für 15 Minuten, gefolgt von einem Waschschrift der Zellen mit PBS.

Marker	Fluorchrom	Färbemethode
CD63	PE	Direkt, einzeln
CXCR1	PE	Direkt, einzeln
CD11b	PE	Direkt, einzeln
CD35	FITC	Direkt, einzeln
DHR123 (Dihydrorhodamin 123)	FITC	Direkt, einzeln
MCB (Monochlorobimane)	Max. Anregung 390 nm (Ultraviolett-Laser), Emission 478 nm (FITC-Kanal)	Direkt, kombiniert mit CD15 oder CD3 u. CD4
CD15s + sek. Ak rat anti-mouse	PerCP	Indirekt, kombiniert mit MCB
CD3	PerCP	Direkt, kombiniert mit CD4 u. MCB
CD4	PE	Direkt, kombiniert mit CD3 u. MCB
IgG1	FITC	Direkt, einzeln
IgG1	PE	Direkt, einzeln
IgG2	PE	Direkt, einzeln

Tab.3.3 „Antikörper zur direkten oder indirekten Markierung der Zellen für die FACS Messung“

CD63, CXCR1, CD11b und CD35 wurden als Maß der Aktivierung der neutrophilen Granulozyten verwendet. Dabei deutet der vermehrte Nachweis von CD63 Antikörpern auf eine erhöhte Freisetzung von NE und somit eine erhöhte Aktivität der neutrophilen Granulozyten hin. CXCR1 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 1) ist ebenfalls ein Oberflächenmarker auf u.a. neutrophilen Granulozyten und gilt als IL-8-Rezeptor. Seine Stimulation durch das proinflammatorische Chemokin startet eine intrazelluläre Signaltransduktionkaskade und beeinflusst so die Entzündungsreaktion. CD11b fungiert als Rezeptor für das Komplementsystem und erfüllt seine Aufgabe im Rahmen der Zelladhäsion und bei der Vermittlung der Phagozytosevorgänge. CD35 fungiert ebenfalls als Rezeptor auf der Zelloberfläche und spielt in der Modulation des Komplementsystems und bei

Phagozytosevorgänge eine Rolle (6); (39). DHR123 (Dihydrorhodamin) kam zur Messung des oxidativen Bursts zum Einsatz. Dabei gilt der Nachweis von DHR123 als Marker für das Vorkommen intrazellulärer Oxidanten (41). MCB (Monochlorobimane) wurde zur Messung des intrazellulären Gehalts an reduziertem Glutathion verwendet (42). CD15s diente als Marker für das Vorkommen von neutrophile Granulozyten, CD3 und CD4 für das Vorkommen von T-Lymphozyten (43). Als Kontrolle wurden Isotypkontrollen eingesetzt, um unspezifische Bindungen der Antikörper auszuschließen. Diese Isotypkontrollen sind eben unspezifisch und können daher auch nur unspezifisch binden. D.h. die Fluoreszenz, die bei Isotyp entsteht ist die unspezifische Bindung, sie wird Ende von der spezifischen Fluoreszenz (z.B. CD63) abgezogen (44).

b) Messung

Hierfür wurde das FACS Canto II verwendet. Die Probe wird von einer Trägerflüssigkeit beschleunigt und die Zellen passieren dadurch hintereinander angeordnet einen Laserstrahl. Die Ablenkung des Strahls erfolgt in Abhängigkeit von den oben erwähnten physikalischen Parametern und es entsteht eine spezifische Streuung des Lichts. Ein axial auftreffender Lichtstrahl erlaubt durch seine Streuung die Bestimmung der Zellgröße (Forward Angle Light Scatter“-FSC) und ein orthogonal auftreffender Lichtstrahl die Bestimmung der Zellgranularität („Side Angle Light Scatter“-SSC). Des Weiteren erfolgt in diesem optischen Detektionssystem die Messung der für die jeweiligen Farbstoffe spezifischen Fluoreszenz. Anschließend geschieht die Umwandlung der optischen in elektrische Signale durch Photomultiplier und Photodioden, was dann wiederum durch eine Software graphisch dargestellt wird.

c) Auswertung

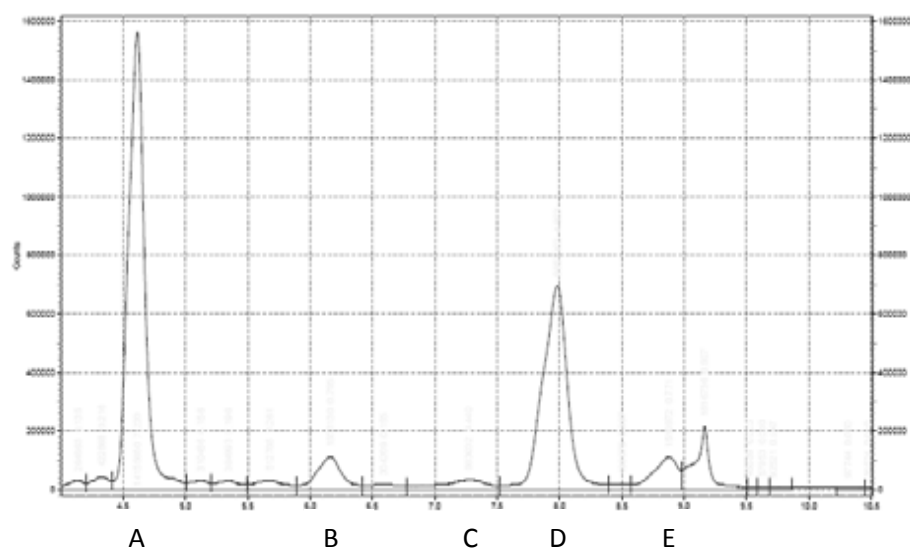
Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Auswertungssoftware (sh. 3.3.5). Um vergleichbare Aussagen über die nur durch die vom jeweiligen Antikörper bedingte Fluoreszenz zu erhalten musste die anhand von Isotypkontrollen bestimmte, unspezifische Antikörperbindung subtrahiert werden.

3.2.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie („high performance liquid chromatography“-HPLC), ist ein Verfahren der Säulen-Flüssigkeits-Chromatographie, das nicht nur die

Auftrennung, sondern auch die fluorimetrische Identifizierung und Quantifizierung der Konzentrationen gewisser Substanzen mittels vorher bestimmter Standardvergleichswerte erlaubt. Chromatographie bezeichnet allgemein physikalische Methoden zur Stofftrennung durch Verteilung auf eine sich bewegende und eine ruhende Phase. Bei der HPLC wird die Probenflüssigkeit mittels einer flüssigen Phase unter hohem Druck über die stationäre Phase transportiert. Je nach den zwischen Probenflüssigkeit und der jeweiligen Phase stattfindenden Wechselwirkungen spricht man von Adsorptions- oder Verteilungschromatographie.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zur Aufbereitung des für die HPLC vorgesehenen Anteils der Proben der, wie unter 3.2.2 beschrieben, gewonnene zellfreie Überstand zügig konditioniert (mit Tributylphosphin und/oder Trichloressigsäure - TCA), bei 1500*g für 5 Minuten zentrifugiert und der erhaltene Überstand in 100µl Portionen bei -70°C für maximal eine Woche eingefroren. Nach Auftauen konnte die Probenflüssigkeit dann weiterverarbeitet werden. Die durch Butylphosphin reduzierten und stabilisierten Thiole und/oder durch TCA gelösten proteingebundenen Thiolverbindungen werden durch SBD-F, einem Reagenz das spezifisch mit Thiolgruppen reagiert, umgesetzt. Bei dem Teil der Proben, bei denen die Eiweißfällung durch TCA vor der Umsetzung durch Butylphosphin durchgeführt wird erfasst man bei der Messung nur die freien, nicht an Proteine gebundenen Thiole. Die entstandenen Derivate weisen eine hohe Stabilität und Fluoreszenz auf. Dies erlaubte eine Quantifizierung des im Blut bzw. Sputum enthaltenen extrazellulären, reduzierten oder oxidierten Glutathions. Die Abbildung 3.2 zeigt ein Beispiel der GSH-Messung mittels HPLC.



A) Cystein, B) Homocystein, C) γ -Glutamylcystein, D) Cysteinyl-Glycin und E) Glutathion

Abb. 3.2 „HPLC-Analyse für GSH“

3.2.6 Photometrie (sh.7.4.5)

In der (bio-)chemischen Analytik erlaubt die Photometrie den qualitativen und quantitativen Nachweis, sowie die Verfolgung der Dynamik chemischer Prozesse von strahlungsabsorbierenden chemischen Verbindungen. Dabei wird mithilfe des sichtbaren Lichtes die Konzentration von farbigen Lösungen bestimmt, da deren Farbe, Absorption und somit auch Transmission von der stofflichen Zusammensetzung abhängt. Mithilfe der Exstinktion lässt sich dann der Transmissionsgrad in Abhängigkeit von der Konzentration darstellen. Anhand einer Standardkurve, bei der die Exstinktion gegen die Konzentration aufgetragen wird, lassen sich unbekannte Konzentrationen von Lösungen messen. Dabei wird ein Wellenlängenbereich gewählt, der von den zu bestimmenden Molekülen oder Ionen absorbiert wird, nicht jedoch von anderen Bestandteilen. Im Rahmen der IGOR-Studie erfolgte der Nachweis von neutrophiler Elastase im Sputum mittels Photometrie. Bei der Verarbeitung wurde nach dem Protokoll vom 19.06.2006 (7.4.5) verfahren. Nachdem entsprechende Verdünnungsreihen von einer Standardprobe, einer Positivkontrolle und der Probe vorbereitet wurden, wurde das Substrat hinzugegeben und die aufbereiteten Proben umgehend bei 405 nm im Photometer gemessen.

3.2.7 Slot Blot (sh.7.4.4)

Durch dieses Verfahren wird die schnelle und unkomplizierte Analyse von Protein, ohne die vorherige Auftrennung durch Elektrophorese ermöglicht. Im Rahmen der Studie sollte anhand des Western Blot (Immunblot) das Ausmaß der Oxidation von Proteinen durch den Nachweis von Carbonylproteinen ermittelt werden. Die Proteinlösung wird dabei direkt auf die Trägermembran aufgetragen, anschließend erfolgt die Detektion der Carbonylproteine mittels des primären Antikörpers gegen 2,4-Dinitrophenylhydrazin und des HRP (horse-raddish peroxidase)-konjugierten sekundären Antikörpers. Dabei wurde analog des in 7.5.4 angehängten Protokolls vorgegangen. Die Auswertung der Bandenintensität erfolgte mittels der AIDA Image Analyser Software (Raytest, Straubenhardt).

3.2.8 ELISA (sh.7.4.6)

ELISA steht für „Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay“ und bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, basierend auf einer enzymatischen Farbreaktion. Durch eine induzierte Antigen-Antikörper-Reaktion wird so das Vorhandensein bestimmter Proteine durch Farbumschlag nachgewiesen. Die für diese Arbeit verwendeten Antikörper, sowie eine Beschreibung des Markertyps finden sich in Tabelle 3.4.

Antikörper	Art
IL-1 β	Proinflammatorischer Marker
IL-8	Proinflammatorischer Marker
TNF- α	Proinflammatorischer Marker
IL-10	Regulierender Marker
TGF- β	Regulierender Marker

Tab. 3.4 „Verwendete Antikörper bei der ELISA Untersuchung“

Diese Antikörper wurden speziell für die Studie selbst konfiguriert. Bei der Aufbereitung der Proben wurde das TGF-Beta DuoSet von R&D Systems und die darin empfohlenen Lösungen verwendet und nach dem hierfür empfohlenen Aufbereitungsprotokoll angewandt (sh. 7.4.6).

Zur Vorbereitung der Platten wurde der Antikörper mit PBS verdünnt und direkt anschließend die 96-well Mikroplatten mit 100 μ l verdünntem Antikörper pro Well beschichtet. Dann wurden die Platten abgedichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde jedes Well dreimal mit einem Waschpuffer gewaschen und anschließend nach zusetzen des Block-Puffers für mindestens eine Stunde inkubiert. Nach einer wiederholten dreimaligen Waschung sind die Platten nun auf das Zufügen des Probenmaterials vorbereitet. Die entsprechend aufbereiteten Proben und Isostandards in Verdünnung wurden zu je 100 μ l je Well auf die Platten gegeben, bedeckt und für zwei Stunden inkubiert. Nach einer erneuten dreimaligen Waschung konnte man 100 μ l Detection Antikörper, anschließend nach 2-stündiger Inkubation und 3-maliger Waschung Streptavidin-HRP hinzugeben. Nach 20-minütiger Inkubation und 3-maliger Waschung wurde 50 μ l Stop-Solution zugefügt und das ganze gut vermischt. Nun ließ sich die optische Dichte der Proben jedes Wells mit einem Mikroplatten-Reader bei 450 nm bestimmen.

3.3 Materialien

3.3.1 Geräte

Zentrifugen: Ultrazentrifuge Variofuge 20 RS von Haereus Sepatech

Tischzentrifuge Centrifuge 415 C von Eppendorf

Zytospin – Zentrifuge von Shandon

Lichtmikroskop

Waage (Präzision 0.001g)

Tiefkühlschrank (-70°C bis -80°C)

Kühlschrank (+4°C) von Bosch

Mischgerät Vortex-Genie 2 von Scientific Industries

pH-Meter

Magnetrührer

Durchflusszytometer (FACS Canto)

HPLC-Station: Pumpe, Controller, Solvent Conditioner von Fa. LKB, Bromma, S

Injektion Valve 7000 mit 20µl Probenschleife von Fa. Rheodyne, Cotati, USA

Shimadzu Data Processor Chromatopac C-R6A und

Fluoreszenzspektromonitor RF535 von Fa. Shimadzu Corporation, Tokyo

HPLC-Säule: Hypersil ODS 3µm (150 x 4,6) mm von Fa. Murder und Wochele, Berlin, D

3.3.2 Glas- und Plastikmaterial

Mikropipetten (1ml, 200µl, 100µl, 20µl) von Eppendorf

Plastikspitzen für Mikropipetten (blau, gelb, weiß) von Grainer

Reaktionsgefäße mit safe lock (2ml, 1,5ml) von Eppendorf

Plastikröhrchen (50ml und 15ml) von Falcon

2ml Spritzen von BD Discardit II

18g Kanülen von BD Microlance 3

Sterile Pinzetten

Zytospin Objektträger von Thermo Electron Corporation

Neubauer Zählkammer

Glasröhrchen von

Zellsiebe (40µl, 100µl) von Falcon

3.3.3 Chemikalien und Puffer

Dulbecco's PBS ohne Ca und MG von PAA laboratories GmbH

TCA von Merck

EDTA von Merck

Perchlorsäure(1M verdünnt auf 0,4mol/l) von Sigma-Aldrich

Tributylphosphin von Sigma-Aldrich

Dimethylformamid von Merck

TRIZOL LS Reagent von Invitrogen, Life technologies

Proteinase Inhibitor complete (Tabletten) von Roche

Ammoniumchlorid-Puffer

PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.2 - 7.4, 0.2 µm filtered)

Wasch-Puffer (0.05% Tween_20 in PBS, pH 7.2 - 7.4.) von R&D Systems Catalog # WA126

Block -Puffer (5% Tween 20 in PBS with 0.05% NaN₃)

Reagent Diluent1 (1.4% delipidized bovine serum) von Opticlear (Biocell Laboratories

Catalog # 1221) oder Reagent Diluent Concentrate 1 (R&D Systems Catalog # DY997)

0.05% Tween 20 in PBS,

pH 7.2 - 7.4, 0.2 µm filtered.

Substrate Solution 1:1 mixture of Color Reagent A(H₂O₂) and Color Reagent B

(Tetramethylbenzidine) von R&D Systems (Catalog # DY999).

Stop Solution - 2 N H₂SO₄ von R&D Systems (Catalog # DY994).

3.3.4 Antikörper

3.3.4.1 Antikörper für FACS

Antikörper	Hersteller	Bestellnummer
CD 63	BD Pharmingen	556020
CXCR 1	BD Pharmingen	555940
CD 11b	BD Pharmingen	555388
CD 35	BD Pharmingen	555452
DHR	Anaspec	85711
IgG1 FITC	BD Pharmingen	550616
IgG1 PE	BD Pharmingen	550617
IgG2 PE	BD Pharmingen	553457
MCB	Fluka (Sigma)	69899
Cd15s + sec Ab rat antimouse	BD Pharmingen	551344 + 50881
CD 3	BD Pharmingen	345766
CD4	BD Pharmingen	555347

Tab. 3.5 „Verwendete Antikörper“

3.3.4.2 Antikörper für ELISA

Cytokin / Chemokin	Hersteller
IL-1b	R & D Systems
IL-8	s.o.
TNF-a	s.o.
IL-10	s.o.
TGF-b	s.o.

Tab. 3.6 „Analysierte proinflammatorische Marker“

3.3.5 Statistik

Die statistische Auswertung aller im Rahmen der IGOR-Studie erhobenen Daten erfolgte zentral am Institut für Statistik. Die Auswertung der in München zusätzlich, im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten erfolgte separat vor Ort. Dies bezieht sich auf die durch die FACS, ELISA und Photometrie gewonnenen Daten, wobei die statistische Auswertung und graphische Darstellung anhand der Software GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) Version 4 erfolgte. Zur Auswertung der Messungen am Durchflusszytometer kam die FACS – Auswertesoftware FACS DIVA von Becton&Dickinson zur Anwendung. Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel angegeben. Die Streuung wurde als Standardfehler des Mittelwertes berechnet. Zur Ermittlung einer statistischen Signifikanz bei der Differenz der Ergebnisse zwischen der Verum- und der Placebogruppe wurde der Wilcoxon Rangsummentest durchgeführt, eine statistische Signifikanz wurde bei p-Werten von $<0,05$ angenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Probandengruppen

Insgesamt wurden für die multizentrisch durchgeführte Studie 166 Patienten rekrutiert, die sich auf 15 verschiedene Zentren verteilten. Nachdem es, anhand der in Kapitel 3 erwähnten Sicherheitskriterien, zum vorzeitigen Ausschluss von 13 zuvor rekrutierten Patienten kam, wurde das Verum an 73 und das Placebo an 80 Teilnehmer ausgegeben. Während der laufenden Studie kam es innerhalb der Verumgruppe bei 9 Probanden, innerhalb der Placebogruppe bei 16 Probanden zu einem frühzeitigen Studienabbruch. Die untenstehende Graphik gibt einen Überblick über den Verlauf der Probandenzahlen über die gesamte Studie (Abb. 4.1).

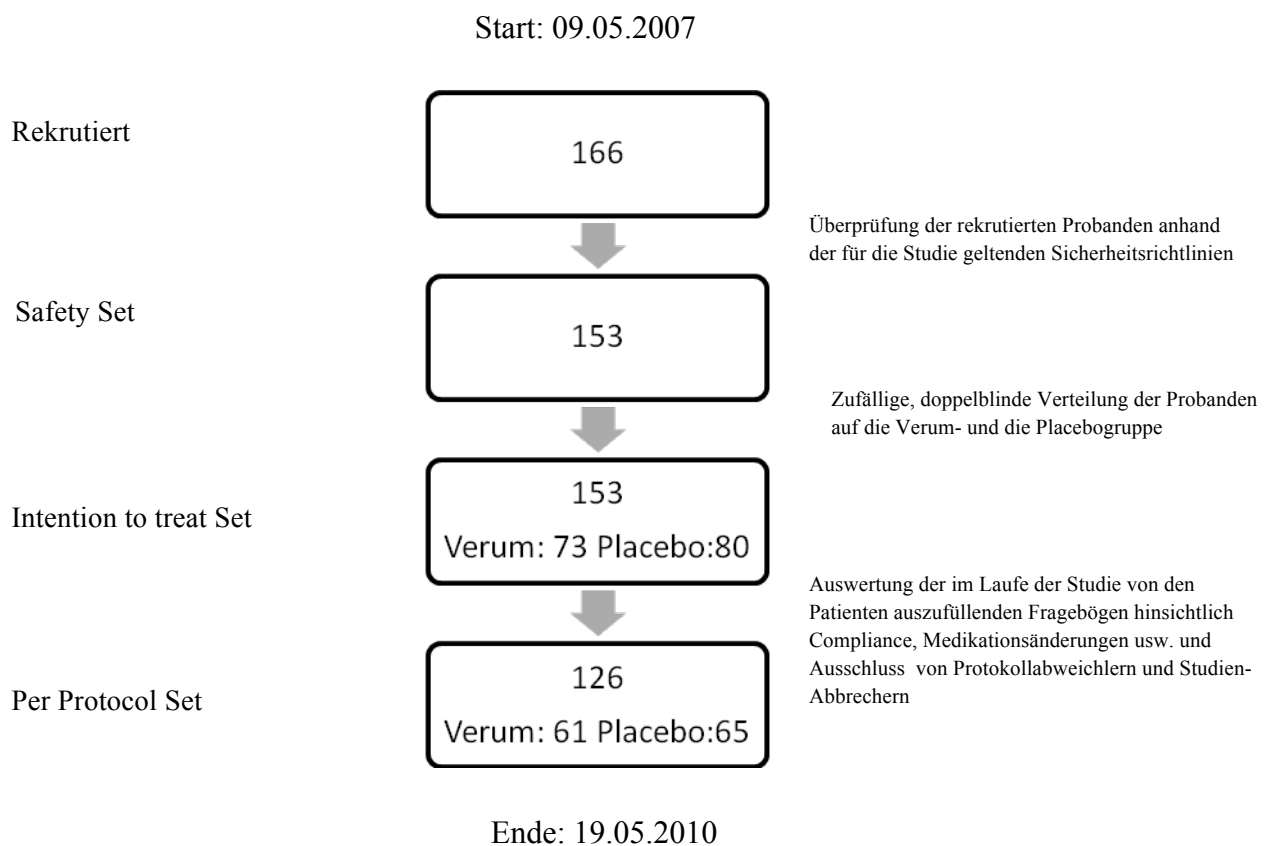


Abb. 4.1 „Übersicht über die Probandengruppe über den Studienverlauf“

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Auswertung auf die Daten der Patienten der Intention-to-treat-Gruppe bezogen, ohne dabei eine Differenzierung innerhalb der Gruppe bezogen auf Geschlecht oder Alter zu treffen. Für einige Untersuchungen wurde lediglich die Probandengruppe des Studienzentrums in München, der Kinderklinik im Dr. v. Haunerschen

Kinderspital betrachtet. Daher im Anschluss eine isolierte Aufführung dieser Patienten. Es wurden hier insgesamt 32 Patienten rekrutiert, zwei mussten die Studie aufgrund der in 3.1 erwähnten Ausschlusskriterien vorzeitig verlassen. Es beendeten 30 Patienten (Verumgruppe: 13 Patienten, Placebogruppe 17 Patienten) laut dem Intention to treat Set die Studie, 27 Patienten (Verumgruppe: 12 Patienten, Placebogruppe: 15 Patienten) beendeten die Studie laut Studienprotokoll.

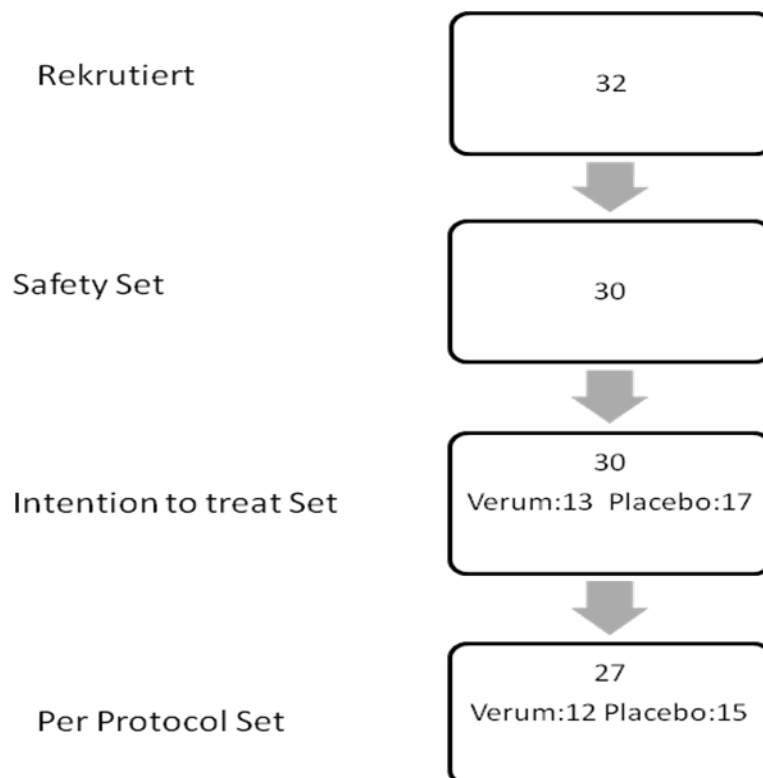


Abb. 4.2 „Übersicht über die Probandengruppe am Studienzentrum München über den Studienverlauf“

Bei den Patienten, die in Verum- und Placebogruppe aufgeteilt wurden, wurden im Laufe der Studie u.a. Alter, Größe, Gewicht und BMI dokumentiert. Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über diese Merkmale der gesamten Studienpopulation bei Einschluss in die Studie. Dabei sind die Werte als arithmetischer Mittelwert (Mittel) mit Standardabweichung angegeben

Parameter	Mittel der Glutathiongruppe (n=73)	Mittel der Placebogruppe (n=80)	Mittel der gesamten Studienpopulation (n=153)
Geschlecht (m/w)	42 / 31	37 /43	79/74
Alter (Jahre)	23,08+/- 9,760	23,00+/- 10,38	23,04+/- 10,056
Größe (cm)	166,2+/- 13,34	163,9+/- 16,02	165,0+/- 14,80
Gewicht (kg)	56,6+/-14,37	54,3+/-16,76	55,4+/-15,66
BMI	20,18 +/- 3,536	19,65+/- 3,599	19,90 +/- 3,567

Tab. 4.1 „Geschlecht, Alter Größe, Gewicht und BMI der Studienteilnehmer zu Beginn der Studie“

Da im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit der Fokus auf der Patientengruppe aus dem Studienzentrum München lag, sind die einzelnen Merkmale dieser Patientengruppe in Tabelle 4.2 genauer dargestellt. Die Tabelle beschreibt neben Alter, Größe und Gewicht der einzelnen Patienten und die jeweilige Zuteilung zur Verum- oder Placebogruppe, auch noch, ob der Patient die Studienanforderungen gemäß Studienprotokoll über den gesamten Verlauf einhalten konnte und ob die Studienteilnahme vorzeitig abgebrochen wurde. Von einer dem Studienprotokoll nicht entsprechende Teilnahme spricht man, bei einer die Toleranzgrenze unterschreitenden Compliance und einer Anwendungsdauer des Glutathions bzw. Placebos von unter 4 Monaten.

Zusammenfassend ergibt sich, anhand der erhobenen Daten, für die Patienten in München, die die Studie beendeten, in folgender Tabelle dargestellter Überblick.

Patienten- Nummer	Alter (Jahre)	Größe (cm)	Gewicht (kg)	Studien- gruppe	Per Protocol Set	Früh- zeitiger Abbruch
0101	21	177	74,4	Placebo		
0102	16	162	57	Placebo		
0103	33	179	63,2	GSH	Nein (Compl)	
0104	26	187	83,5	Placebo	Nein (<4M)	x
0105	22	178	53,3	GSH		
0106	19	182	63,5	Placebo		
0107	12	151	33	GSH		x
0108	13	159	38,5	GSH	Nein (Compl)	
0109	19	164	156,6	Placebo		
0110	24	170	61	GSH		
0111	14	162	53	GSH		
0112	32	179	67	Placebo		
0113	19	159,7	73	GSH		
0114	21	178	70	GSH	Nein (Compl)	
0115	24	160	52,3	GSH		
0116	21	168	50	Placebo		
0117	41	163	52,8	Placebo		
0118	29	168	52,6	GSH		
0119	28	173	54,4	Placebo		
0120	29	168	59,6	Placebo		
0121	22	158	53			x
0122	16	174	58,7			x
0123	26	163	52	GSH		
0124	11	135	30,5	Placebo		
0125	22	173,6	74	Placebo		x
0126	20	185	66	Placebo		
0127	23	159	50,9	Placebo		
0128	22	182	76,7	Placebo		
0129	32	170	69	GSH		
0130	10	132	27	Placebo		
0131	9	137	27	Placebo		
0132	11	159	47	GSH		

Tab. 4.2 „Detaillierte Aufführung für Alter, Größe und Gewicht der Studienteilnehmer am Studienzentrum München“

Parameter	Mittel der Glutathiongruppe (n=12)	Mittel der Placebogruppe (n=15)	Mittel der gesamten Studienpopulation (n=27)
Alter (Jahre)	22,3	21,4	21,8
Größe (cm)	167,1	164,4	165,6
Gewicht (kg)	57,1	54,3	55,5
BMI	20,4	20,1	20,24

Tab. 4.3 „Geschlecht, Alter Größe, Gewicht und BMI der Studienteilnehmer in München zu Beginn der Studie“

4.2 Daten der Spirometrie

4.2.1 FEV₁

Der Fokus der Studie lag auf eine Änderung der FEV₁, also des Atemvolumens, welches nach maximaler Inspiration forciert in der ersten Sekunde ausgeatmet werden kann. Dieser und weitere, zur Beurteilung der Lungenfunktion dienende spirometrische Parameter, wie die FVC und die MEF wurden an den jeweiligen Visiten (sh. auch 3.2.1) mittels Spirometer ermittelt. Anschließend wurde die Entwicklung der FEV₁, der mit Glutathion inhalierenden Gruppe mit den entsprechenden Werten der Placebogruppe, innerhalb der 6 monatigen Studie verglichen. Als Ausgangswert diente der aus den Visiten V1 und V2 errechnete Mittelwert (Baseline). Die entsprechenden Ergebnisse, angegeben in Absolutwerten (l), sind im Überblick in Tabelle 4.4 dargestellt. Hierbei konnten alle, an den einzelnen Zentren erhobenen Werte Anwendung finden. Es sind neben Ausgangswerten die Ergebnisse der Visiten V3, V4 und V5 und der errechnete p-Wert, jeweils für die Verumgruppe, die Placebogruppe und für die gesamte Studiengruppe aufgeführt. So sollte untersucht und statistisch belegt werden, ob die Inhalation von Glutathion, anstelle des Placebos einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der Einsekundenkapazität hat. Ein p-Wert von <0,05 (gegenüber der Baseline) weist dabei auf einen signifikanten Einfluss der Glutathioninhalation auf die Entwicklung von FEV₁ hin.

Visiten Nr.	Mittel der Glutathiongruppe	Mittel der Placebogruppe	Mittel der gesamten Studienpopulation	p-Wert gegenüber baseline
baseline (Mittelwert aus V1 und V2)	2,2309+/-0,70412	2.1281+/- 0,74058	2,1772+/-0,72287	
V3	2,2947+/-0,72806	2,2033+/-0,79422	2,2471+/-0,76198	0,3038
V4	2,3287+/-0,76504	2,1383+/-0,80104	2,2314+/-0,78658	< 0,05
V5	2,3039+/-0,81372	2,1314+/-0,77805	2,2142+/-0,79739	0,1378

Tab. 4.4 „Entwicklung der FEV₁ über den Studienverlauf“

Daraus lässt sich ablesen, dass beim Vergleich der FEV₁ Werte bei Visite V 4 mit den baseline-Werten ein signifikanter Unterschied zwischen der Glutathion- und der Placebogruppe besteht, was auf einen positiven Einfluss der Glutathioninhalationstherapie hindeutet.

4.2.2 Weitere spirometrische Parameter

Neben der forcierten Einsekundenkapazität wurden im Rahmen der Studie noch weitere Messparameter dynamischer Lungenvolumina dokumentiert (sh. auch 3.2.1) und die Differenz der Ergebnisse beider Gruppen auf ihre Signifikanz hin überprüft. Hierbei handelt es sich um die forcierte Vitalkapazität (FVC), also das Atemvolumen, das nach maximaler Inspiration ausgeatmet werden kann, sowie den maximalen expiratorische Fluss bei 25 bzw. 50% der FVC (MEF25, MEF50). Zusätzlich wurden die Werte der FEV₁ und FVC noch in Relation zu den vorhergesagten Normalwerten (pnv = predicted normal values) gesetzt. Diese ergeben sich aus den altersabhängigen Normalwerten. Auch hier lag das Interesse der Studie auf einer Entwicklung der Parameter im Verlauf der Inhalationstherapie und sich daraus ergebenden, möglichen Unterschieden der Gruppen zueinander. Die Daten sind in Tab. 4.5 dargestellt.

Spirometrie-Parameter	VisitNr.	p-Wert	Differenz beider Gruppen
FVC	V3-BL	< 0,05	signifikant
	V4-BL	< 0,05	signifikant
	V5-BL	0,1591	nicht signifikant
FEV ₁ /pnv	V3-BL	0,4781	nicht signifikant
	V4-BL	< 0,05	signifikant
	V5-BL	0,1167	nicht signifikant
FVC/pnv	V3-BL	0,0527	nicht signifikant
	V4-BL	< 0,05	signifikant
	V5-BL	0,2305	nicht signifikant
MEF25	V3-BL	0,3634	nicht signifikant
	V4-BL	< 0,01	signifikant
	V5-BL	0,1189	nicht signifikant
MEF50	V3-BL	0,8820	nicht signifikant
	V4-BL	< 0,01	signifikant
	V5-BL	0,5258	nicht signifikant

Tab. 4.5 „Entwicklung weiterer spirometrischer Parameter im Studienverlauf“

Wie schon bei der Ermittlung der Entwicklung der FEV₁ bei der Verum- und der Placebogruppe im Vergleich zueinander zeigt sich auch bei den übrigen spirometrischen Parametern eine Differenz zwischen beiden Gruppen bei der vierten Visite verglichen mit dem Baseline-Mittelwert. Lediglich die Messwerte für die FEV₁ lassen schon bei der dritten Visite eine signifikante Unterscheidung der Patientengruppen zu.

4.3 Effekte der Glutathion-Inhalationstherapie auf Redoxparameter in Sputum und Blut

4.3.1 Glutathionkonzentrationen in Atemwegsflüssigkeit und Serum

Im Rahmen der IGOR-Studie erfolgte am Studienzentrum München mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) die Auftrennung, Identifizierung und Quantifizierung der unterschiedlichen Thiole in den aufbereiteten Blut- und Sputumproben. Zusätzlich erfolgte die Ermittlung der Zusammensetzung des entsprechenden Thiolgehalts aus

gebunden und freien Thiolen. Bei den untersuchten Thiolen handelte es sich um Glutathion, Cystein, Glutamyl-Cystein, Homocystein und Cystein-Glycin.

Bei der Messung des totalen Glutathiongehalts in der Atemwegsflüssigkeit und Zellen der Atemwege waren signifikante Ergebnisse im Laufe der Studie und beim Vergleich der Gruppen untereinander zu verzeichnen.

Der Gehalt des totalen Glutathions im Sputum von CF-Patienten, die im Rahmen der Studie das Verum erhielten, erhöhte sich im Studienverlauf von V2 bis V4. Die erhaltene Differenz ist signifikant.

Beim Vergleich der Verum- mit der Placebogruppe zeigte sich bei V3 bis V5 ein signifikanter Unterschied an totalem Glutathion.

Dies ist in Abb. 4.3 graphisch dargestellt. Auf der x-Achse ist die Zeit in Monaten, auf der y-Achse die Konzentration für freies Glutathion (links) und Gesamtglutathion (rechts) in pmol/l angegeben. Die schwarzen Punkte zeigen die Mittelwerte der Verumgruppe, die weißen Punkte die der Placebogruppe. Die Standardabweichungen sind durch die Balken dargestellt.

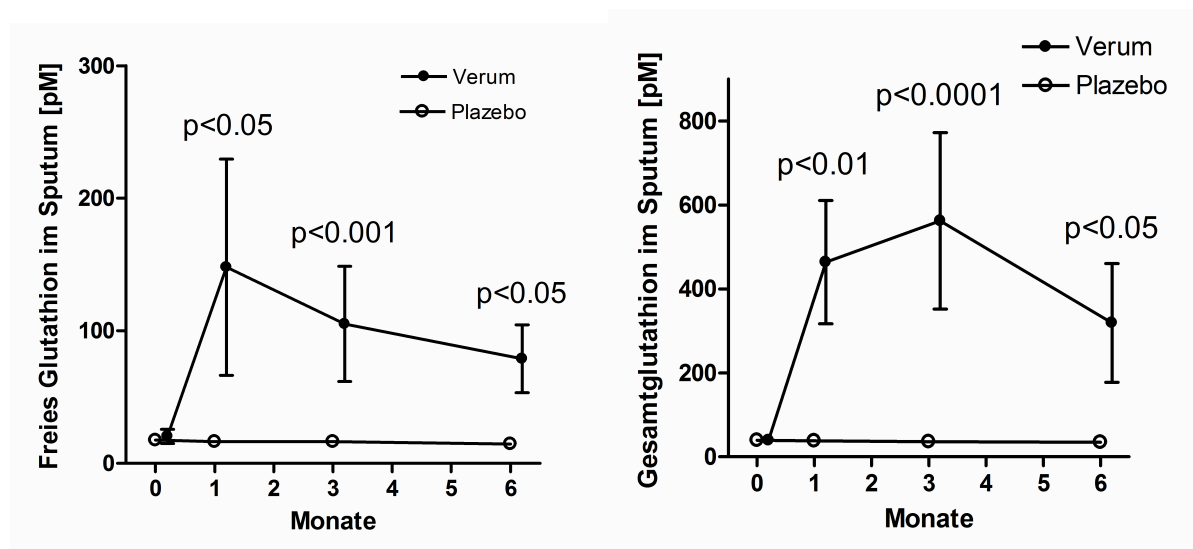


Abb. 4.3 „Graphische Darstellung der Ergebnisse der HPLC Messungen für Glutathion im Studienverlauf“

Für freies Glutamyl-Cystein (V3, V4), freies Homocystein (V4) und Gesamt-Cysteinyl-Glycin (V3, V4) kam es im Verlauf zu signifikant erhöhten Konzentrationen. Die übrigen Parameter blieben unter Therapie statistisch unverändert (sh. Tab. 4.6).

	GSH (N = 73)			Placebo (N = 80)			
Differenz	N	Mittelwert	SD	N	Mittelwert	SD	p-Wert
	Freies Cystein [pM]						
V3-V2	25	-26.5	76.38	30	3.6	46.66	0.2908
V4-V2	23	-7.7	79.85	25	-1.0	36.15	0.9835
V5-V2	23	-15.7	87.30	27	-3.6	68.99	0.9845
	Gesamtcysteine [pM]						
V3-V2	24	-31.9	134.97	30	-6.9	106.29	0.8824
V4-V2	23	2.0	128.87	25	-13.7	157.94	0.3219
V5-V2	23	-20.5	161.22	27	-13.1	108.94	0.8153
	Freies Glutamyl-cystein [pM]						
V3-V2	21	-2.3	5.61	25	1.6	4.07	0.0152
V4-V2	19	-1.8	4.32	23	0.9	4.62	0.0292
V5-V2	19	-1.9	3.98	23	0.2	3.95	0.1002
	Gesamtglutamyl-cystein [pM]						
V3-V2	23	0.0	15.59	25	0.2	8.60	0.8527
V4-V2	19	3.5	18.34	23	-1.8	13.24	0.3244
V5-V2	21	-1.3	12.37	23	-2.6	11.83	1.0000
	Freies Homocystein [pM]						
V3-V2	24	-1.4	3.15	28	-0.0	2.31	0.1713
V4-V2	22	-1.1	2.59	24	0.5	2.46	0.0336
V5-V2	23	-0.9	2.71	26	-0.3	2.63	0.5609
	Gesamthomocystein [pM]						
V3-V2	24	-3.9	11.52	28	-1.8	9.16	0.7480
V4-V2	22	-2.2	16.98	24	-1.2	10.38	0.9212
V5-V2	23	-1.0	12.17	26	-1.0	7.49	0.9680
	Freies Cysteinyl-glycin [pM]						
V3-V2	24	0.3	25.12	29	1.3	15.90	0.6106
V4-V2	23	4.7	19.08	24	-2.7	15.39	0.1732
V5-V2	23	0.7	21.71	26	-4.0	16.97	0.6236
	Gesamtcysteinyl-glycin [pM]						
V3-V2	24	46.2	126.45	30	-1.9	32.64	0.0375
V4-V2	23	43.8	104.50	25	-8.4	44.55	0.0069
V5-V2	23	20.6	81.83	27	-9.5	39.36	0.2932

Tab. 4.6 „Ergebnisse der HPLC Messungen in Sputum für Cystein, Glutamyl-Cystein, Homocystein und Cysteinyl-Glycin im Studienverlauf“

Für die Ergebnisse der HPLC Messungen der Blutproben ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei der Quantifizierung der unterschiedlichen Thiole (sh. Tab. 4.7).

GSH (N = 73)			Placebo (N = 80)			
N	Mittelwert	SD	N	Mittelwert	SD	p-Wert
Freies Glutathion [pM]						
25	2.4	9.24	32	0.2	1.11	0.4842
Gesamtglutathion [pM]						
25	0.2	4.01	32	-0.6	6.94	0.5358
Freies Cystein [pM]						
25	0.5	8.03	32	-0.1	3.57	0.2436
Gesamtcystein [pM]						
25	3.5	66.83	32	1.8	39.21	0.7295
Freies Glutamyl-cystein [pM]						
24	-0.0	1.06	31	0.0	1.41	0.7403
Gesamtglutamyl-cystein [pM]						
25	0.1	1.92	32	-0.1	1.17	0.9423
Freies Homocystein [pM]						
25	0.0	0.63	31	-0.0	0.22	0.7667
Gesamthomocystein [pM]						
25	0.1	4.35	32	0.5	2.64	0.3721
Freies Cysteinyl-glycin [pM]						
25	0.4	3.67	32	-0.0	0.85	0.2535
Gesamtcysteinyl-glycin [pM]						
25	-1.0	10.72	32	-1.5	8.18	0.8281

Tab. 4.7 „Ergebnisse der HPLC Messungen in Blut für Glutathion, Cystein, Glutamyl-Cystein, Homocystein und Cysteinyl-Glycin im Studienverlauf (V5 gegen V2)“

4.3.2 Intrazelluläre Glutathionkonzentrationen

Um die eine eventuelle Änderung der intrazellulären Glutathionkonzentration im Verlauf der Studie festzustellen erfolgte die intrazelluläre Anfärbung der aus Sputum isolierten Zellen mit MCB und anschließend die Messung der Fluoreszenz mit dem Durchflusszytometer (FACS), zur Bestimmung des intrazellulären Glutathion-Gehalts (sih. 3.2.4).

Vor allem für die in den Sputumproben untersuchten neutrophilen Granulozyten ergab sich hier eine signifikante Änderung des intrazellulären Glutathion-Gehalts im Laufe der Studie. Auch beim Vergleich der Messergebnisse von Zellen aus Sputumproben von der Placebo- und der Verumgruppe miteinander konnte eine signifikante Erhöhung nach drei und sechs

Monaten gegenüber dem Ausgangswert nachgewiesen werden. Diese Entwicklungen waren bei den Blutproben weit weniger deutlich nachweisbar. In Abb. 4.5 sind die Daten der detektierbaren Fluoreszenz nach Anfärbung der Zellen mit MCB (und somit der intrazelluläre Gehalt an reduziertem Glutathion) im Laufe der Studie für die analysierten Sputum- und Blutproben graphisch dargestellt. Auf der Abszisse ist die Zeit in Monaten, auf der Ordinate die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von Glutathion abgebildet. Die schwarzen Punkte zeigen die Mittelwerte der Verumgruppe, die weißen Punkte die der Placebogruppe. Die Standardabweichungen sind durch die Balken dargestellt.

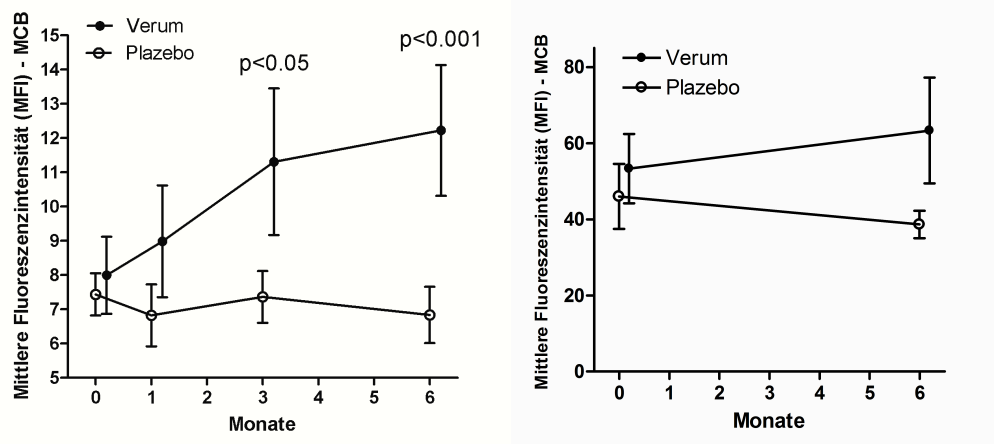


Abb. 4.5 „Graphische Darstellung des intrazellulären Glutathion-Gehaltes in Sputum (links) und Blut (rechts) im Studienverlauf“

4.3.3 Proteincarbonylierung

Mit Hilfe des Slot-Blot-Verfahrens erfolgte die Analysierung des Proteingehalts der Proben und der prozentualen Oxidation der Proteine (sh. 3.2.7). Dabei konnte weder für den Proteingehalt noch für deren Oxidation eine signifikante Veränderung im Laufe der Studie oder Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen festgestellt werden (sh. Tab. 4.8).

4.4 Effekte der Glutathion-Inhalationstherapie auf die Inflammation

4.4.1 Zelldifferenzierung

Eine differenzierende Zellzählung wurde nach Herstellung entsprechender Zytospin-Präparate durchgeführt (sh. 3.2.3). Der prozentuale Anteil der Zellpopulationen an der Gesamtzellzahl über den Studienverlauf zeigte keinen Unterschied zwischen der Verum- und der Placebogruppe (Tab. 4.8). Dies galt auch für die neutrophilen Granulozyten, die die dominierende Gruppe der Abwehrzellen im Rahmen der chronischen Atemwegsentzündung bei CF sind.

Auch auf die Viabilität (v.a. bei neutrophilen Granulozyten) konnte kein Effekt der inhalativen Glutathiontherapie nachgewiesen werden. In Tab. 4.8 sind die, auf diese Weise ermittelten Werte für die Viabilität der Zellen im Verlauf der Studie dargestellt.

	GSH		Placebo		
Biochemische Variabel	N	Mittelwert, SD	N	Mittelwert, SD	p-Wert, u-test
Gesamtzellzahl und Zellviabilität					
Gesamtzellzahl [mio/mL]	24	4.8, 4.46	22	5.3, 6.33	0.6053
Zellzahl pro g Sputum [Mio.]	19	4.4, 6.65	17	6.1, 13.24	0.8991
Zellviabilität [%]	19	86.4, 8.07	19	88.1, 7.10	0.5590
Differenzielle Zellzahl					
Gezählte Zellen	17	370.6, 68.60	24	364.7, 96.69	0.8129
Neutrophile Granulozyten [%]	17	94.2, 5.85	24	90.6, 19.82	0.6151
Basophile Granulozyten [%]	17	0.2, 0.39	24	0.3, 0.72	0.8744
Eosinophile Granulozyten [%]	17	0.7, 0.78	24	1.2, 1.72	0.3508
Makrophagen [%]	17	4.0, 5.33	24	2.6, 3.18	0.7803
Lymphozyten [%]	17	0.9, 1.20	24	1.1, 1.14	0.4411

Tab. 4.8 „Gesamtzellzahl, Zellviabilität und differenzielle Zellzählung im Sputum“

4.4.2 Neutrophile Elastase

Im Rahmen der IGOR-Studie erfolgte mittels Photometrie der Nachweis von neutrophiler Elastase im Sputum (3.2.6). Für die untersuchten Proben ergab sich dabei keine signifikante Differenz bezogen auf den Studienverlauf oder zwischen den Studiengruppen, wie in Abb. 4.6 dargestellt ist. Auf der x-Achse sind die Visiten, auf der y-Achse die Konzentration von neutrophiler Elastase in $\mu\text{g/ml}$ aufgetragen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Balken) für die Verumgruppe sind schwarz, die der Placebogruppe weiß dargestellt.

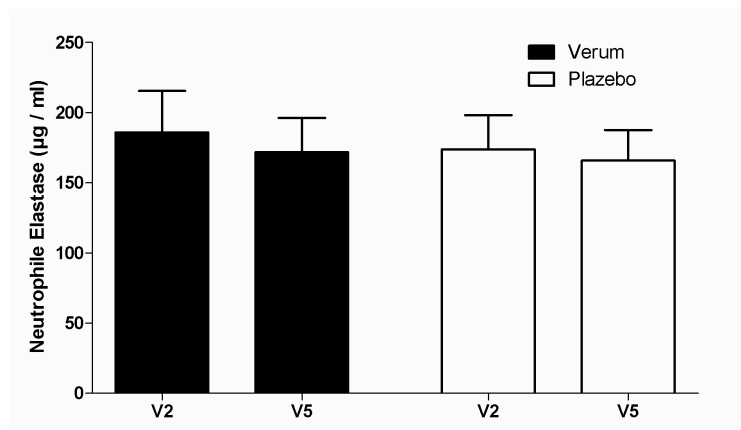


Abb. 4.6 „Darstellung der NE Konzentration im Studienverlauf“

4.4.3 Proinflammatorische Marker in Sputumproben

Für keine der untersuchten Entzündungsmediatoren wie Zytokine (IL-10, IL-8, TNF-alpha, IL-1beta), Chemokine und Lipidmediatoren konnte ein signifikanter quantitativer Unterschied im Studienverlauf oder zwischen der Placebo- und der Verumgruppe nachgewiesen werden (Tab. 4.9).

	GSH		Placebo		p-Wert, u-test
Biochemische Variabel	N	Mittelwert, SD	N	Mittelwert, SD	
IL-10 [pg/ml]	25	11.1, 16.53	32	7.0, 10.10	0.1898
IL-8 [pg/ml]	25	3236.4, 2053.83	32	3116.5, 2109.19	0.8407
TNF- α [pg/ml]	25	36.1, 64.62	32	30.1, 61.83	0.4821
IL-1 β [pg/ml]	25	769.0, 1061.40	32	444.7, 819.89	0.4166

Tab. 4.9 „Zytokine und Chemokine im Sputum“

4.5 Effekt der Glutathion-Inhalation auf die Neutrophilenaktivität

Die Neutrophilenaktivität wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit an den im Studienzentrum in München aufbereiteten Proben anhand von Messungen spezifischer Oberflächenmarker mittels FACS untersucht (3.2.4)

Bei den untersuchten Oberflächenmarkern handelte es sich um CD63, CD35 und CD11b, die als generelle Aktivierungsmarker bei neutrophilen Granulozyten zählen. Für keinen dieser untersuchten Marker in Blut- und Sputumproben ergaben sich signifikante Unterschiede, sowohl in Hinblick auf den Studienverlauf, als auch bei den beiden Studiengruppen. Dies ist in Tab. 4.10 beispielhaft für die analysierten Sputumproben graphisch dargestellt.

Des Weiteren erfolgte auch die indirekte Messung der Phagozytoseaktivität von neutrophilen Granulozyten unter Verwendung von DHR.

Die beiden Studienpopulationen zeigen im Sputum und im Blut weder untereinander, noch zueinander signifikante Unterschiede im Verlauf der Studie (Tab. 4.10).

	GSH		Placebo		p-Wert, u-test
Biochemische Variabel	N	Mittelwert, SD	N	Mittelwert, SD	
CD63 in Sputum (MFI)	11	2.2, 0.54	13	2.7, 1.19	0.2819
CXCR1 in Sputum (MFI)	11	1.1, 0.42	13	1.1, 0.51	0.9299
CD11b in Sputum (MFI)	11	4.8, 2.50	13	5.7, 2.79	0.4865
CD35 in Sputum (MFI)	11	1.9, 0.58	13	2.6, 1.82	0.5415
DHR in Sputum (MFI)	11	6.1, 5.23	13	10.6, 8.85	0.1470
CD63 in Blut (MFI)	12	1.2, 0.12	16	1.2, 0.37	0.7398
CXCR1 in Blut (MFI)	12	6.0, 3.48	16	7.1, 4.82	0.3650
CD11b in Blut (MFI)	12	9.5, 5.56	16	6.3, 3.85	0.1435
CD35 in Blut (MFI)	12	2.3, 1.15	16	1.8, 0.77	0.2089
DHR in Blut (MFI)	12	21.6, 22.92	16	16.4, 17.10	0.9445

Tab. 4.10 „Oberflächenexpression von Aktivierungsmarker auf neutrophilen Granulozyten im Sputum und im Blut“

4.6 Unterschiede von Patienten mit CF und einer gesunden Vergleichsgruppe

Im Rahmen der Studie und der vorliegenden Doktorarbeit wurden am Studienzentrum München einzelne Messungen neben den Studienteilnehmern auch an aufbereiteten Blut- und Sputumproben von Gesunden durchführt.

Die Glutathion-Konzentrationen von freiem (Abb. 4.7 A) und totalem Glutathion (Abb. 4.7 B) in Sputumproben waren bei CF-Patienten signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollen, während es bei den Blutproben weder für das freie (Abb. 4.7 C) noch für das Gesamtglutathion (Abb. 4.7 D) einen signifikanten Unterschied gab. Auf der x-Achse sind die Visiten, auf der y-Achse die Konzentration von freiem Glutathion (links) oder Gesamt-Glutathion in pmol/l aufgetragen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Balken) für die Verumgruppe sind schwarz, die der Placebogruppe weiß und die der gesunden Kontrollen grau dargestellt.

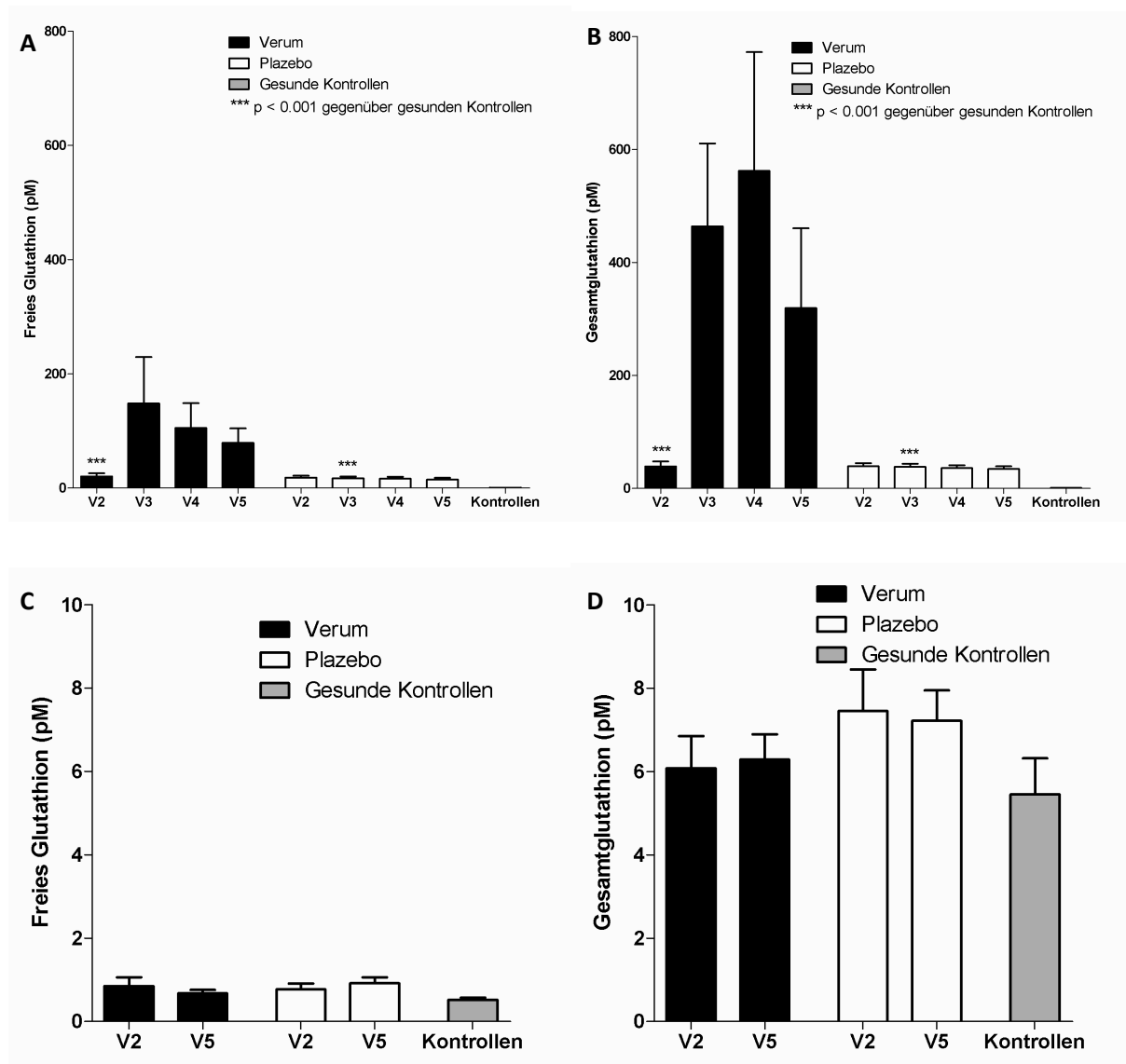


Abb. 4.7 „Vergleichende Darstellung des Glutathion-Gehalts im Studienverlauf“

Bei der Gesamtzellzahl sowie der Differentialzellzählung fiel ein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit CF und der gesunden Vergleichsgruppe auf. Besonders deutlich war der quantitative Unterschied erwartungsgemäß bei der Anzahl der neutrophilen Granulozyten (Abb. 4.8), die als Merkmal der chronischen Entzündungsvorgänge im Rahmen der CF gelten. Auf der x-Achse sind die Visiten, auf der y-Achse die Konzentration von freiem Glutathion (links) oder Gesamt-Glutathion in pmol/l aufgetragen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Balken) für die Verumgruppe sind schwarz, die der Placebogruppe weiß und die der gesunden Kontrollen grau dargestellt.

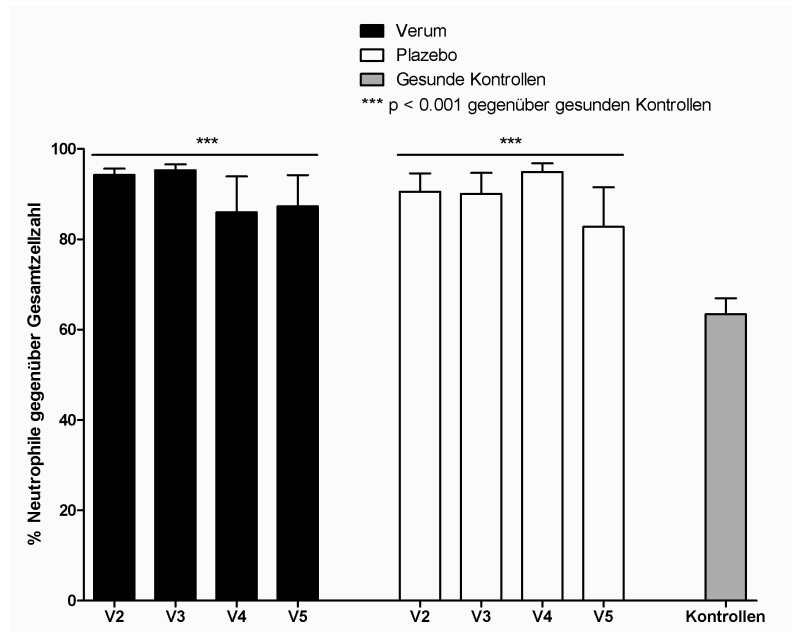


Abb. 4.8 „Vergleichende Darstellung des prozentualen Neutrophilenanteils im Gesamtzellpool im Studienverlauf“

Die größere Zahl und die Aktivität der Neutrophilen (in aufbereiteten Sputum- und Blutproben) bei Studienteilnehmern im Vergleich zur gesunden Vergleichsgruppe konnte auch bei der Fluoreszenzmessung der entsprechenden Oberflächenmarker (v.a. CD63, CD11b und CD35) mittels FACS nachgewiesen werden

Die quantitative Erfassung der neutrophilen Elastase mittels Photometrie zeigte deutliche Unterschiede zwischen Patienten und Gesunden, was wiederum Rückschlüsse auf Anzahl und Aktivität der Neutrophilen im Rahmen des Krankheitsbildes zulässt.

In Abb.4.9 ist das beispielhaft für CD63 (Abb. 4.9 A), CD11b (Abb. 4.9 B) und CD35 (Abb. 4.9 C) dargestellt. Auf der x-Achse sind die Visiten, auf der y-Achse die mittlere Fluoreszenzintensität aufgetragen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Balken) für die Verumgruppe sind schwarz, die der Placebogruppe weiß und die der gesunden Kontrollen grau dargestellt.

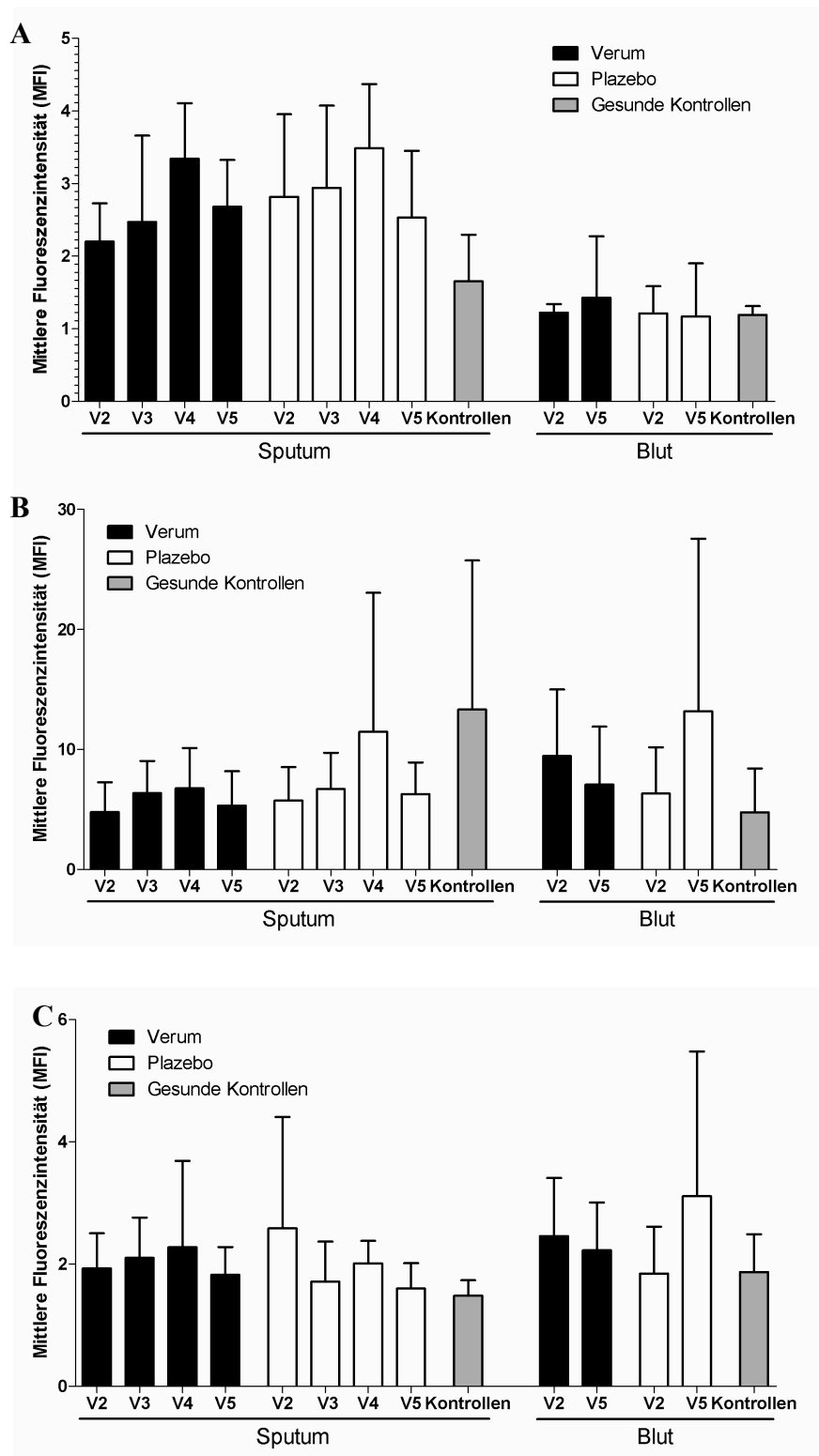


Abb. 4.9 „Vergleichende Darstellung der Messergebnisse für drei die Neutrophilenaktivität kennzeichnenden Oberflächenmarker“

5. Diskussion

5.1 Studie und Probanden

Für die Studie wurden an insgesamt 15 Studienzentren 166 CF-Patienten rekrutiert. Diese mussten die Einschlusskriterien, wie Mindestalter und die gesicherte Diagnose der zystischen Fibrose (sh. 3.1 Studiendesign und Probanden) erfüllen. Nach Überprüfen der für die Studie geltenden Ausschlusskriterien wurden die verbliebenen 153 Patienten in die Studie eingeschlossen. Diese wurden zufällig in eine mit dem Verum (646mg, in 4ml sterilem Wasser gelöstem GSH-Na) und eine mit dem Placebo (4ml einer 0,9%igen Kochsalzlösung) inhalierende Gruppe eingeteilt. So erhielten 73 Patienten das Verum und 80 Patienten das Placebo zur Inhalation. Laut Studienprotokoll sollten die Patienten das zugeteilte Medikament über 24 Wochen zweimal täglich inhalieren.

Neben den klinischen und spirometrischen Untersuchungen, sowie der labortechnischen Analyse von Blut- und Sputumproben, die alle multizentrisch durchgeführt wurden, erfolgten im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit am Studiocenter München weitere Untersuchungen (sh. Tabelle 5.1). Diese konzentrierten sich im Besonderen auf die Ermittlung von Entzündungsmarkern, die kennzeichnend für die CF und weitere chronische, proinflammatorische Erkrankungen sind. Diese Untersuchungen wurden an 30 Patienten durchgeführt, die die Ein- und Ausschlusskriterien erfüllten. Dabei bekamen 13 Patienten das Verum und 17 Patienten das Placebo zur Inhalation verabreicht.

Methode	Durchführung und Ort der Analyse
Spirometrische Untersuchungen (FEV ₁ , FVC, FEV ₁ /pnv, FVC/pnv, MEF25, MEF50)	Multizentrisch, jeweils vor Ort
HPLC (Thiole wie GSH in Blut- und Sputumproben)	Multizentrisch, in München
Gesamtzellzählung und -färbung	Multizentrisch, jeweils vor Ort
Differenzierte Zellzählung	Multizentrisch, in München
Durchflusszytometrie (CD63, CD35, CD11b, DHR, MCB)	Monozentrisch, in München
Photometrie (NE)	Multizentrisch, in München
ELISA und Multiplex (IL-1 β , IL-8, IL-10, TNF- α)	Multizentrisch, in München
Slot Blot (Proteincarbonylierung)	Multizentrisch, in München

Tab. 5.1 „Überblick über Untersuchungs- und Analysemethoden, Durchführungsstandorte“

Anhand der Studie sollte primär die Wirkung der Inhalationstherapie mit Glutathion auf die Lungenfunktion und sekundär auch auf die Inflammation und den Redox Status untersucht werden. Weiterhin sollten wissenschaftliche Beweise für den Nutzen der Behandlung gefunden und eine klare Hypothese über die mögliche Wirkungsweise von Glutathion entwickelt werden.

Sich aus dem Studiendesign ergebende Einschränkungen der Studie sind u.a. die relativ geringe Probandenzahl. So blieben von den ursprünglich 166 rekrutierten Patienten nach Ausschluss der die Sicherheitsrichtlinien nicht erfüllenden Teilnehmer 153 („Intention to treat“) Patienten übrig. Nach Ausschluss der deutlich vom Studienprotokoll abweichenden Probanden sowie derjenigen die selbstständig vorzeitig ausstiegen, blieben nur 126 Teilnehmer übrig („Per Protocol Set“), bei denen eine uneingeschränkte Auswertung der Daten erfolgen konnte. Am Studiencenter München beendeten 27 der 32 ursprünglich

rekrutierten, bzw. der 30, den Sicherheitsrichtlinien entsprechenden Patienten die Studie protokollgemäß. Einige Untersuchungen wie z.B. totale und differenzierte Zellzählung, Messung von Zytokinen / Chemokinen und Proteincarbonylierung konnten aus organisatorischen Gründen nur in ausgewählten Zentren durchgeführt werden, was auch hier zu einer weiteren Reduzierung der verfügbaren Datenmenge führte. Dennoch sollte eine größtmögliche Datenmenge zur Ermittlung und Belegung eines Effekts der inhalativen Glutathiontherapie auf den entzündlich bedingten Krankheitsverlauf der CF zur Verfügung stehen. Daher erfolgte im Rahmen der Doktorarbeit die Auswertung aller Daten, die von Patienten, die die Sicherheitsrichtlinien erfüllten, erhoben wurden.

Des Weiteren ist damit zu rechnen, dass es im Verlauf der Studie zu einem Complianceverlust kam, wofür u.a. die Stagnation der Verbesserung der Werte für die FEV₁ bei den spirometrischen Untersuchungen nach der vierten Visite spräche.

5.2 Effekt der inhalativen Glutathiontherapie auf die spirometrischen Parameter

Ein besonderer Fokus bei der Untersuchung eines möglichen positiven Effekts der inhalativen Glutathiontherapie lag auf der Entwicklung der Lungenfunktion im Verlauf der Studie. Dieser Schwerpunkt lässt sich durch die Pathophysiologie der CF erklären. Kennzeichnend für den Krankheitsverlauf sind die chronisch-progressive Entzündung der Atemwege und die daraus folgende Lungenfibrose. Die Bildung eines zähflüssigen Sekrets in den Bronchen, das vom Flimmerepithel nicht ausreichend abtransportiert werden kann, führt zu Husten, Bronchiektasen, häufig wiederkehrenden Lungeninfekten, schweren Lungenentzündungen und zunehmender Lungeninsuffizienz (45). Dies ist oft der einschränkende Faktor für die Lebensqualität und -dauer im Rahmen der CF Erkrankung, daher beziehen sich viele Behandlungsansätze, wie auch die Inhalationstherapie im Rahmen der IGOR-Studie, auf eine Eindämmung und Kontrolle des inflammatorischen Geschehens in den Atemwegen (46).

Eine Verbesserung, der anhand der Spirometrie ermittelten FEV₁ Werte kann laut FDA (U.S. Food and Drug Administration) nur in Kombination mit weiteren unterstützenden Daten als beweisend für den Nutzen einer Therapie gesehen werden. Dazu zählen die Dokumentation einer ausbleibenden Verschlechterung der Lungenerkrankung sowie die Häufigkeit von Antibiotikaaanwendungen und Krankenhausaufenthalten im Laufe einer Studie (30). Dennoch wird eine Verbesserung der FEV₁ häufig als Messgröße des Erfolgs einer Therapieform

angenommen, da eine verbesserte Lungenfunktion ein allgemein anerkannter, lebensverlängernder Faktor im Rahmen der CF Erkrankung ist (47).

Bei der IGOR-Studie zeigte sich bei der Auswertung der spirometrischen Daten eine signifikante Verbesserung der Lungenfunktion bei der Verum-Patientengruppe im Vergleich zur Placebo-Patientengruppe. Dieser signifikante Unterschied lässt sich für die FEV₁ an der Visite 4 belegen. Bei der Visite 5 ist noch immer ein Trend einer FEV₁-Besserung in der Verumgruppe zu sehen, jedoch war dieser Unterschied nicht mehr statistisch signifikant. Auch für die übrigen bestimmten Lungenfunktionsparameter (FVC, FEV₁ IST / SOLL, FVC IST / SOLL, MEF 25, MEF 50) lässt sich eine Entwicklung im Studienverlauf und die signifikante Differenz der beiden Patientengruppen für die vierte, nicht für die fünfte Visite nachweisen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Glutathioninhalationstherapie einen nachweisbaren, positiven Einfluss auf die Lungenfunktion hat und dieser nicht allein auf dem physiologischen Effekt einer regelmäßig durchgeführten Inhalation, sondern auch auf dem Medikament selbst beruht.

Die mangelnde Signifikanz der an der fünften Visite erhobenen Werte lässt sich am ehesten durch die im Laufe der Studie insgesamt nachlassenden Compliance der Patienten und mit einem besonders starken Complianceverlust nach der vierten Visite erklären. Um eine Aussage über die, für die Beurteilung der erhobenen Daten ausschlaggebende Regelmäßigkeit der Inhalation treffen zu können, waren einerseits die Probanden angehalten die durchgeführten Inhalationen in ihrem Studientagebuch festzuhalten. Andererseits wurden am Ende der Studie die verbrauchten Medikamentengläschen der Probanden ausgezählt. Diese Auswertung der Tagebücher und Auszählung der Medikation zeigten jedoch keinen relevanten Complianceverlust über die Studie.

5.3 Redoxparameter

Wie schon in den vorherigen Kapiteln erwähnt, führen die für die CF typischen chronischen und von neutrophilen Granulozyten dominierten Entzündungen der Atemwege auf mehreren Wegen zu vermehrtem oxidativem Stress. Somit dienen auch unterschiedliche, den oxidativen Stress widerspiegelnden Redoxparameter als hilfreiche Biomarker, um den Krankheitsverlauf der CF zu dokumentieren und eventuell auch den Fortschritt der Krankheit und die damit einhergehenden Destruktionen des Lungengewebes zu beurteilen. Verwertbar sind diese

Daten allerdings nur in Kombination mit klinischen und labortechnischen Parametern, genauso wie durch diese Biomarker alleine die Wirksamkeit einer Therapie nicht zu belegen wäre (10). Im Rahmen der IGOR-Studie sollte nachgewiesen werden, dass die inhalative Glutathiontherapie zur Stabilisation des Redoxgleichgewichts und Verminderung des oxidativen Stresses führt. Das sollte anhand der Messung bestimmter Redoxparameter belegt werden. Gleichzeitig hoffte man, eine Korrelation zwischen einer Änderung der Redoxparameter und der verbesserten Lungenfunktion nachzuweisen.

5.3.1 Glutathion

Ein wichtiges, den intrazellulären Redox Status darstellendes Redoxpärchen ist GSH/GSSG. Ein Ungleichgewicht des reduzierten und oxidierten Glutathions ist zugleich Folge und Kofaktor für (weiteren) oxidativen Stress. Darüber hinaus wirkt reduziertes Glutathion als wichtiges Antioxidans und ist dabei besonders in der, die Atemwege benetzenden, Flüssigkeitsschicht in hohen Konzentrationen vorhanden. Zusätzlich hat Glutathion noch eine mukolytische Wirkung (48).

Diese bedeutsame, multiple Funktion erklärt die vielen Anwendungsansätze von Glutathion in der CF-Therapie. Gleichzeitig lässt die Ermittlung von freiem und gebundenem Glutathion, sowie die die Messung des GSH/GSSG Verhältnisses Rückschlüsse auf den oxidativen Stress und die inflammatorischen Reaktionen zu (49).

Die Messungen erfolgten mittels der HPLC, hier wurden neben dem Glutathion noch weitere Thiole untersucht, allerdings wird im Rahmen dieser Doktorarbeit nur auf die Ergebnisse hinsichtlich der Glutathionmessung eingegangen. Dabei zeigt sich eine signifikante Erhöhung des freien und totalen Glutathion-Gehalts im Laufe der Inhalationsstudie im Sputum der Patientengruppe, die das Verum zur Inhalation erhielten. Die Erhöhung ist bis zur fünften Visite signifikant nachweisbar und unterschiedlich zu den Werten der, mit dem Placebo inhalierenden Vergleichsgruppe.

Das Ausbleiben einer signifikanten Änderung des Glutathion-Gehalts im Blut der Probandengruppen nach der Inhalation des Verums, lässt sich dadurch Erklären, dass das Glutathion bei dieser Anwendungsweise nicht systemisch wirksam ist.

Neben dem totalen Glutathion-Gehalt erfolgte im Rahmen der Studie auch die Ermittlung des Verhältnisses von reduziertem und oxidiertem Glutathion mittels HPLC. Gerade von einer Erhöhung des Anteils an reduziertem Glutathion verspricht man sich einen Nutzen, da dieses die als Antioxidans wirksame Form des Thiols ist (50).

Im Rahmen von Entzündungsreaktionen kommt es zu einer schnellen Oxidation des äußerst reaktionsfreudigen reduzierten Glutathions. Das oxidierte Glutathion ist nicht mehr antiinflammatorisch wirksam. Bei CF kann man davon ausgehen, dass diese Oxidation noch schneller geschieht, da der erhöhte oxidative Stress einen erhöhten Bedarf an Antioxidation mit sich bringt. Für einen tatsächlichen therapeutischen Nutzen müsste reduziertes Glutathion also intra- und extrazellulär in ausreichender Menge vorliegen und somit noch als Radikalfänger wirksam sein.

Um den Nutzen einer Therapie nachzuweisen, wäre darüber hinaus der Nachweis dieser Anreicherung und wenn möglich auch eine entsprechende Korrelation der vermehrten Anreicherung von reduziertem Glutathion mit einer Verbesserung der Lungenfunktion und weiteren Biomarkern notwendig.

Die intrazelluläre Anreicherung des Glutathions wies man im Rahmen dieser Doktorarbeit durch durchflusszytometrische Messungen in neutrophilen Granulozyten nach.

Hier ließ sich nach V4 ein signifikanter Effekt der Therapie, der auch nach V5 noch bestand der anhand der Sputumproben erhobenen Daten nachweisen ($p < 0,05$ und nach V5 $p < 0,001$). Auch beim Vergleich der Verum- und der Placebogruppe war der Effekt signifikant unterschiedlich.

Für die Analyse der intrazellulären Glutathionanreicherung standen die Proben der Studienteilnehmer des Studienzentrums in München zur Verfügung. Proben von anderen Zentren konnten nicht berücksichtigt werden, da eine Konditionierung der Zellproben und die folgende Messung der Fluoreszenz mittels FACS eine zügige Verarbeitung der Proben nach der Gewinnung voraussetzt.

5.3.2 Proteinoxidation

Bei oxidativem Stress kommt es vermehrt zu einer Oxidierung von Proteinen durch die dann in großen Mengen vorhandenen freien Radikale. In Folge der Oxidierung kommt es zur Bildung von Carbonylgruppen, deren Menge Hinweis auf die Intensität des oxidativen Stresses gibt (18). Diese Carbonylierung sollte im Rahmen der IGOR-Studie durch das Slot-Blot-Verfahren nachgewiesen werden. Dabei wurde nach Bestimmung des Gesamtproteingehalts die prozentuale Oxidation dieser Proteine analysiert. Durch den Nachweis des Ausmaßes der Proteindegradierung, was als Biomarker für den oxidativen Stress und den Redox Status gilt, kann man also durch Auswertung dieser Messungen, eine Aussage über die pulmonalen Entzündungsvorgänge und deren Schweregrad treffen und so zusätzlich eine Aussage über einen möglichen Effekt der inhalativen Glutathiontherapie machen (51). Es ließ sich im Rahmen der IGOR-Studie kein signifikanter Effekt auf die Proteincarbonylierung nachweisen weder im Verlauf der Studie innerhalb der Probandengruppe, noch beim Vergleich der Gruppen miteinander. Dies könnte an der geringen Zahl der zur Verfügung stehenden Proben liegen. Denn auch die Analyse der prozentualen Proteincarbonylierung konnte nur an einzelnen Zentren, im Rahmen von Substudien durchgeführt werden. So standen zur Auswertung in München nur die dort gesammelten Proben zur Verfügung.

5.4 Zelluläre Differenzierung und Aktivität

Die chronischen Entzündungsvorgänge in den Atemwegen bei CF führen auf mehreren Wegen (sh. Kapitel 1) zu einer vermehrten Aktivierung der humoralen und zellulären Immunabwehr. Dabei stehen v.a. die in hoher Zahl anwesenden neutrophilen Granulozyten im Vordergrund, die charakteristischerweise die Entzündungsvorgänge in den Atemwegen dominieren (52). Doch nicht nur die Menge der neutrophilen Granulozyten ist bei Patienten mit zystischer Fibrose auffällig. Gleichzeitig ist ihre Funktion aufgrund der ständigen Aktivierung durch die chronische Entzündung und die bakteriellen Infektionen gestört. Diese gestörte Funktion und Fehlregulation der pro- und antiinflammatorischen Marker können sowohl für im Blut zirkulierende Neutrophile (16), als auch für in der Lunge vorkommende Neutrophile (6) nachgewiesen werden. Gleichzeitig hat auch ein Glutathionmangel nachgewiesener Weise Einfluss auf die Funktion des Immunsystems und auf die antioxidative

Funktion von Zellen (53). Daher hoffte man, dass die regelmäßige Glutathioninhalation einen positiven Einfluss auf die Entzündungsvorgänge haben könnte und zu einer Veränderung der Differenzierung, Anzahl und Aktivität der Entzündungszellen, im Besonderen der neutrophilen Granulozyten, kommt.

5.4.1 Zelldifferenzierung

Um den Effekt der Inhalation mit Glutathion auf die Zelldifferenzierung zu untersuchen, wurden aus den, bei den einzelnen Visiten gewonnen Sputumproben Zellen isoliert und eine Differentialzellzählung durchgeführt. Durch den Vergleich der Ergebnisse hoffte man, u.a., einen Rückgang des prozentualen Anteils an neutrophilen Granulozyten und somit den positiven Effekt des Therapieansatzes nachzuweisen. Es konnte zwar ein deutlicher Unterschied des prozentualen und des totalen Anteils der neutrophilen Granulozyten zwischen den von CF-Patienten gewonnenen Proben und den Vergleichsproben von gesunden Probanden im Sputum nachgewiesen werden, aber keine signifikante Änderung der Zellzahlen im Verlauf der Glutathiontherapie beim Vergleich der Proben innerhalb der CF-Patientengruppen.

Hier gilt zu bedenken, dass die erhöhte Zahl an neutrophilen Granulozyten eine Antwort auf die chronische und über einen langen Zeitraum bestehende Entzündung der Atemwege ist. Eventuell müsste eine längere Therapiedauer realisiert werden, um die Anzahl zu reduzieren. Zusätzlich könnte eine, aufgrund der vorhergehend erläuterten Ergebnisse, vermutete nachlassende Compliance im Studienverlauf dazu geführt haben, dass es praktisch, zu einer zusätzlichen Verkürzung, der eigentlich sechs monatigen Inhalationstherapie kam.

5.4.2 Aktivität und Funktion der neutrophilen Granulozyten

Die pathologischen und oft selbstdestruktiven und überschießenden Vorgänge bei der Immunabwehr in den Atemwegen von CF-Patienten sind nicht nur auf die erhöhte Anzahl an neutrophilen Granulozyten zurückzuführen, sondern auch auf eine gestörte Funktion und fehlregulierte Aktivität dieser (54). Somit könnte auch eine Änderung im Bereich der zellulären Reaktionen auf die mögliche Wirksamkeit der inhalativen Glutathiontherapie hinweisen.

Der Nachweis einer stärkeren Expression von Aktivierungsmarkern (CD63, CD35, CD11b) an der Oberfläche von aus den Sputumproben isolierten neutrophilen Granulozyten ist Zeichen für eine überhöhte Aktivität. Durch die Analyse der Expression dieser Marker anhand durchflusszytometrischer Messungen nach Konditionierung der Zellen wurde der Einfluss der Glutathioninhalation in dieser Studie gemessen. Neben der Analyse der Aktivität ist auch die Analyse spezieller Funktionen wie die Phagozytose eine Möglichkeit die Schwere der entzündlichen Vorgänge oder eine eventuelle Regression derselben zu beschreiben. Die Phagozytoseaktivität wurde näherungsweise durch die DHR-Methode gemessen.

Die Tatsache, dass diese Untersuchungen keinen signifikanten Hinweis lieferten, könnte wiederum in der geringen Anzahl an Probanden liegen, die in diese Substudie einbezogen werden konnten. Für die durchflusszytometrischen Analysen standen wieder nur die in München gesammelten Proben der 27 „Per-Protocol-Set“- Patienten zur Aufbereitung und Auswertung zur Verfügung. Gleichzeitig könnte auch eine zu kurze Studiendauer den mangelnden Einfluss auf die Neutrophilenaktivität erklären.

5.4.3 Neutrophile Elastase

Neutrophile Granulozyten setzen während der chronischen Atemwegsentzündung vermehrt Proteasen, wie auch die NE frei. Zusätzlich kommt es durch den vermehrten, unreglementierten Untergang von neutrophilen Granulozyten zu weiterer Freisetzung von NE. Der entstandene Überschuss an NE kann nicht vollständig durch die vor Ort existierenden Mechanismen neutralisiert werden (55); (56). Dadurch kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Proteasen und Antiproteasen im Lungengewebe, was wiederum eine Aktivierung der humoralen und zellulären Abwehr bedingt, wodurch weitere Neutrophile aktiviert werden (45). Somit ist die NE nicht nur Mitursache, sondern gleichzeitig auch Folge der pathologischen, chronischen Entzündung und dient so auch als weiterer Biomarker zur Beurteilung des Ausmaßes der Entzündungsvorgänge.

Allerdings erbrachte der mittels Photometrie durchgeführte Nachweis von NE keine signifikanten Ergebnisse bezüglich eines Einflusses der inhalativen Glutathiontherapie auf die Menge an vorhandener NE. Auch hier haben vermutlich der Complianceverlust im Laufe der Studie und die relativ kurz angesetzte Behandlungsdauer einen negativen Einfluss auf die erhobenen Daten. Des Weiteren zeigten sich auch im Bezug auf die Zellnekrose und die

Neutrophilenaktivierung die beide zur Freisetzung von NE führen keine Effekte durch die Behandlung. Somit konnte auch keine Auswirkung auf die Menge der vorliegenden neutrophilen Elastase erwartet werden.

5.4.4 Zytokine und Chemokine

Die Ausschüttung von Zyto- und Chemokinen kann bei oxidativem Stress durch eine veränderte Gentranskription beeinflusst werden. Bei vermehrtem oxidativen Stress führt die erhöhte Aktivierung von NF- κ B zu einer vermehrten Ausschüttung von TNF- α . Reduziertes Glutathion hat als starkes Antioxidans großen Einfluss auf den zellulären Redox Status und somit auch auf die Produktion von Zyto- und Chemokinen (57). Vorhergegangene Studien belegen, dass gewisse proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , Interleukin 1 β (IL-1 β) und Interleukin 8 (IL-8) bei Patienten mit CF in der Regel erhöht und andere, antiinflammatorische und regulatorische Marker, wie IL-10, typischerweise erniedrigt sind (54); (58). Gleichzeitig wurde nachgewiesen, dass diese pathologische Veränderung mit einer reduzierten Lungenfunktion und einem schlechteren Allgemeinzustand korreliert (59). Daraus ergibt sich, warum man im Rahmen der Untersuchung der Wirksamkeit der inhalativen Glutathiontherapie auch diese Biomarker auf eine eventuelle Änderung im Verlauf der Studie und bei dem Vergleich der Patientengruppen untereinander erhob und analysierte.

Allerdings lieferte die Auswertung der Messungen der in dieser Studie gemessenen Cyto- und Chemokine (TNF- α , IL-1 β , IL-8 und IL-10) keine signifikante Veränderung im Laufe der Studie und somit keinen Hinweis auf eine Wirksamkeit der Inhalationstherapie.

Wenn man das längerfristige Vorliegen einer ausreichenden Menge an reduziertem Glutathion und die somit möglichst dauerhafte Änderung des Redox Status als Voraussetzung für eine signifikante Änderung der Menge an Cyto- und Chemokine nimmt, könnte das Ausbleiben dieser Änderung in der schon vorher erwähnten kurzen Studiendauer, aber auch an der nachlassenden Compliance liegen.

Allgemein lässt sich zu den in 5.3 und 5.4 aufgeführten Ergebnissen sagen, dass sowohl die Inflammation und ihre Folgen, als auch der oxidative Stress ein dauerhaftes Problem im Rahmen von durch chronische Entzündungen geprägten Erkrankungen sind. Dies bedingt allgemein, dass die auf 6 Monate begrenzte Anwendung der Glutathioninhalation noch nicht

ausreichend lange sein könnte. Des Weiteren ist es möglich, dass die Dauer und auch die Regelmäßigkeit der Inhalation im Laufe der Studie nachließ und sich ein Complianceverlust bei den Patienten einstellte. Diese Vermutung erhärtet sich auch durch die Tatsache, dass die positive Entwicklung der spirometrischen Parameter nach der vierten Visite deutlich nachlässt.

5.5 Vergleich der IGOR-Studie mit anderen Glutathion-Studien

Die IGOR-Studie ist die erste langfristige (24 wöchige), randomisierte, Placebo-kontrollierte, Phase II Studie, die die Wirksamkeit der inhalativen Glutathiontherapie untersucht. Die Untersuchung einer möglichen positiven Auswirkung, sowie der gesundheitlichen Unbedenklichkeit einer inhalativen oder auch oralen Glutathion-Supplementation stand schon in der Vergangenheit im Mittelpunkt von *in vivo* und *in vitro* Studien. Der Grund für diesen Forschungsansatz liegt darin, dass der durch die Genmutation defekte CFTR-Kanal auch für den Transport von Glutathion ins ELF verantwortlich ist (2), und gleichzeitig nachgewiesen wurde, dass der Glutathion-Gehalt im ELF bei CF-Patienten erniedrigt ist (31). Das spricht für die wichtige Rolle von reduziertem Glutathion im Entzündungsgeschehen und die pathologischen Folgen des Glutathionmangels. Auch die Rolle des reduzierten Glutathions als Antioxidans in Kombination mit der im Verlauf der CF-Erkrankung vermehrten oxidativen Schädigung des Lungengewebes begründet die genauere Untersuchung, inwieweit eine Glutathion Supplementation sinnvoll und wirksam ist.

Bei den ersten Glutathion-Inhaltionsstudien mit CF-Patienten konnte bereits die Unbedenklichkeit der Anwendung von relativ hohen Glutathion Dosen in Lösung (bis zu 450mg/l) zur Inhalation nachgewiesen werden (35); (37). Gleichzeitig ließ sich durch beide Studien die Anreicherung von oxidiertem Glutathion im ELF durch Analyse der mittels BALF gewonnenen Proben belegen. In der von Griese et al. initiierten Studie konnte zusätzlich noch eine Verbesserung der FEV₁ nachgewiesen werden (37). Die bei der IGOR-Studie erhobenen Daten unterstützen diese Ergebnisse, mit dem Vorteil, dass bei der IGOR-Studie eine höhere Probandenzahl, über längere Dauer, den Wirkstoff inhalierten. Das verleiht den Ergebnissen eine deutlich höhere Evidenz. Nachdem die ersten beiden Studien nicht Placebo kontrolliert waren, wurde in einer dritten Studie von Bishop (38) neben der Glutathion-Inhalation von einigen Patienten auch die Inhalation mit einer Kochsalzlösung

durchgeführt. Hier konnte neben der Sicherheit und der vermehrten Anreicherung von reduziertem Glutathion im ELF auch eine Verbesserung des FEV₁, des allgemeinen Befindens der Patienten und weiterer, klinisch relevanter Parameter verzeichnet werden. Allerdings zeigte sich eine Verbesserung der FEV₁ auch bei Patienten, die mit dem Placebo inhalierten. Dies wurde im Rahmen dieser Studie mit den beschränkten Studienbedingungen (kleine Patientengruppe und kurze Anwendungsdauer), sowie einer nachgewiesenen, ebenfalls positiven Auswirkung der Inhalation mit hypertonem Kochsalzlösung, die in dieser Studie einer ca. 4 %-igen Lösung entsprach, erklärt. Aus vorhergegangenen Studien ist bekannt, dass die Inhalation einer hypertonen Kochsalzlösung im Bereich von 3%-7% eine Verbesserung des Abtransports des Mukus durch das Flimmerepithel der Atemwege zur Folge hat (60); (61). Die Inhalation ist auch bei Kindern sicher und übt positiven Einfluss auf die Lungenfunktion aus (62). Zu den Ergebnissen dieser dritten Studie konnte die IGOR-Studie weitere Erkenntnisse beisteuern. So zeigte sich beim Vergleich der Lungenfunktion während und nach der gesamten Inhalationsdauer eine signifikante Verbesserung der Lungenfunktion in der Glutathiongruppe. Allerdings war diese Verbesserung nur bei V4 signifikant, bei V5 wird die Signifikanz knapp verfehlt. Auch hier lässt sich die nachlassende Compliance als Grund annehmen. Zusätzlich war eine (zumindest bis V4) signifikante Verbesserung nicht nur im Laufe der Studie zu verzeichnen, sondern auch im Vergleich der Verum- mit der Placebogruppe. Somit konnte die These der Sicherheit und Wirksamkeit einer langfristigen Inhalation mit Glutathion entsprechend der vorherigen Studien bestätigt werden - dieses nun mit höherer Evidenz, aufgrund der größer und längerfristig angelegten Studie. Entsprechend zu den vorhergehenden Studien zeigte sich auch bei der IGOR-Studie die Anreicherung des Glutathions in der Atemwegsflüssigkeit, wobei hier die zu untersuchenden Proben anhand der Sputuminduktion, nicht mittels BALF gewonnen wurden. Diese im Rahmen der IGOR-Studie angewandte Methode ist auf Grund der reliablen Ergebnisse und der für den Patienten angenehmeren und schonenderen Anwendung mittlerweile Goldstandard für Analysen der Atemwegsflüssigkeiten bei Patienten mit CF. Dadurch, dass die Probengewinnung durch Sputuminduktion erfolgte, war im Gegensatz zur BALF eine wiederholte Probengewinnung im Verlauf der Studie möglich, sodass die Aussagekraft der Ergebnisse erhöht und somit eine genauere Beurteilung der Wirksamkeit erlaubt war. Da sich die Verbesserung der Lungenfunktion und auch die Anreicherung des Glutathions hier das erste Mal auch über einen längeren Zeitraum nach verfolgen ließ, war zu erwarten, dass dies nun auch eine messbare Auswirkung auf andere Biomarker haben könnte, die bei Patienten mit CF

pathologisch auffielen. Analog zu den vorherigen Studien zeigten sich aber auch hier keine signifikanten Veränderungen im Laufe der Studie oder im Vergleich zu den mit dem Placebo inhalierenden Patienten. Man kann also annehmen, dass auch die IGOR-Studie wie die vorherigen Studien noch nicht von ausreichender Dauer war, um einen signifikanten Einfluss auf das ungünstige, von chronischen Entzündungen geprägte Atemwegsmilieu und die dadurch veränderten Biomarker zu haben. Weitere Studien könnten zeigen ob eine längere Anwendungsdauer, eine höhere Dosis und eine kontinuierlich gute Compliance letztendlich auch Auswirkung auf die chronisch-pathologischen Entzündungsvorgänge und die begleitenden Biomarker haben könnte. Des Weiteren wäre zu überprüfen ob ein positiver Einfluss der Glutathioninhalation im Rahmen einer präventiven Therapie von effektiverem Nutzen ist.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der IGOR-Studie angefertigt. Diese Studie ist eine multizentrische, randomisierte, placebokontrollierte Doppelblindstudie zur Untersuchung der Sicherheit und Wirksamkeit einer 24-wöchigen inhalativen Glutathiontherapie bei CF-Patienten. In der Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass die inhalative Glutathiontherapie positiven Einfluss auf die Lungenfunktion und die pulmonale Inflammation bei Patienten mit CF hat.

Im Rahmen der Studie erfolgte die Einteilung von 153 Probanden in eine mit Glutathion inhalierende Verumgruppe (73 Patienten) und eine mit isotonem Kochsalz inhalierende Placebogruppe (80 Patienten). An mehreren, durch das Studienprotokoll vorgegebenen Untersuchungsterminen erfolgten neben der klinischen Untersuchung und Messung der Lungenfunktion der Probanden auch die Gewinnung von Sputum- und Blutproben zur weiteren labortechnischen Analyse. Dabei kamen unterschiedliche Untersuchungsverfahren wie die HPLC, FACS, ELISA, Multiplex, Slot Blot und Photometrie zur Anwendung. Die gesammelten Proben wurden auf entzündungstypische und für die CF charakteristische Marker hin untersucht. Zusätzlich wurden die gewonnenen Daten miteinander und mit den klinischen Parametern verglichen.

So sollte ein möglicher positiver Effekt der Inhalationstherapie untersucht und nachgewiesen werden.

Es ergab sich eine Verbesserung der Lungenfunktion (FEV_1 , FVC, MEF25, MEF 50) im Verlauf der Studie und beim Vergleich zwischen der Placebo- und der Verumgruppe. Nach 3 Monaten war der Effekt signifikant nachweisbar, jedoch nach 6 Monaten waren die Werte wieder weniger aussagekräftig. Der Glutathion-Gehalt in der Atemwegsflüssigkeit und in neutrophilen Granulozyten nahm im Verlauf der Studie signifikant zu.

Auf andere inflammatorische und Redox-abhängige Parameter war kein Effekt durch Glutathion nachweisbar.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich folgende Schlussfolgerungen ableiten:

- Eine 24-wöchige inhalative Glutathiontherapie hatte einen positiven Einfluss auf die Lungenfunktion bei Patienten mit CF.

- Durch die Inhalation erhöhte sich die Konzentration von Glutathion der Atemwegsflüssigkeit und in den Zellen der Atemwege.
- Eine inhalative Glutathiontherapie über den Zeitraum von 6 Monaten hatte keinen messbaren Einfluss auf inflammatorische oder Redox-abhängige Vorgänge in den Atemwegen von CF-Patienten. Um einen möglichen positiven Einfluss der Inhalationstherapie auf weitere typische Biomarker der pulmonalen Inflammation nachzuweisen, sind weitere Studien notwendig. Dabei sollte die Studiendauer möglichst lange gewählt werden und auf eine gute Compliance der Probanden geachtet werden. Nur dann ist eine Änderung der durch die jahrelangen chronischen Entzündungen pathologisch veränderten Bedingungen zu erwarten.
- Eine inhalative Glutathiontherapie über 24 Wochen ist gut verträglich und tolerierbar

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

- 1.1 Graphische Darstellung der Entwicklung der durchschnittlichen Lebenserwartung von CF-Patienten in westlichen Ländern
- 1.2 Zusammenhänge und Wechselwirkungen im Rahmen eines Entzündungsgeschehen der Atemwege, was sich bei CF-Patienten besonders ungünstig auswirkt
- 1.3 Schematische Darstellung von Glutathion als Strukturformel
- 1.4 Graphische Darstellung des Glutathionmetabolismus
- 3.1 Darstellung der FACS Messung als Graph
- 3.2 Darstellung der HPLC-Analyse für GSH. Auf der x-Achse ist die Zeit in Minuten, auf der y-Achse die Zahl der Ereignisse (Fluoreszenzintensität) angegeben. Die Peaks stellen folgende Thiole dar: A) Cystein, B) Homocystein, C) γ -Glutamylcystein, D) Cysteinyl-Glycin und E) Glutathion dar.
- 4.1 Überblick über den Verlauf der Teilnehmeranzahl der Probanden (Verum- und Placebogruppe) über die gesamte Studienzeit
- 4.2 Überblick über den Verlauf der Teilnehmeranzahl der Probanden (Verum- und Placebogruppe) in München über die über die gesamte Studienzeit
- 4.3 Graphische Darstellung des totalen und des anteiligen freien Glutathiongehalts in den Sputumproben (V2, V3, V4, V5) anhand der Ergebnisse der HPLC Messungen
- 4.4 Graphische Darstellung des Thiolgehaltes (jeweils für Glutathion, Cysteine, Glutamyl-Cysteine, Cysteine-Glycin und Homocystein) der Blutproben (V2 und V5) anhand der Ergebnisse der HPLC Messungen
- 4.5 Graphische Darstellung des intrazellulären Glutathiongehaltes in Blut- und Sputumproben, jeweils anhand der Messergebnisse der Durchflusszytometrie
- 4.6 Vergleichende Darstellung des NE-Gehaltes der Sputumproben (von V2 und V5) anhand photometrischer Analyse und Auswertung
- 4.7 Vergleichende Darstellung des Glutathion-Gehalts (freies und totales Glutathion) in Sputum- (4.7A, 4.7B) und Blutproben (4.7C, 4.7D) von Probanden mit CF und einer gesunden Vergleichsgruppe über den Studienverlauf hinweg
- 4.8 Vergleichende Darstellung des prozentualen Neutrophilenanteils in den Sputumproben der Probanden mit CF und einer gesunden Vergleichsgruppe, nach Auszählung unter dem Lichtmikroskop

- 4.9 Vergleichende Darstellung der Neutrophilenaktivität in Sputumproben von Probanden mit CF und einer gesunden Vergleichsprobe, nach Anfärbung mit entsprechenden Oberflächenmarker (CD63 - 4.9A, CD11b - 4.9B, CD35 - 4.9C) und Fluoreszenzmessung im Durchflusszytometer.

7.2 Tabellenverzeichnis

- 1.1 Aufführung und Charakterisierung der verschiedenen CFTR-Mutationsformen
- 1.2 Überblick über die Einteilung und Häufigkeit der meist verbreiteten Mutationsklassen
- 1.3 Auflistung von Biomarkern, die erlauben den Verlauf einer Entzündung der Atemwege zu beurteilen.
- 3.1 Auflistung der angefärbten Zelltypen, sowie das Resultat der Pappenheim Färbung bei Verwendung eines Phosphatpuffers nach Weise
- 3.2 Überblick über die im Rahmen der Fluoreszenzfärbung verwendeten Fluorochrome, sowie das Spektrum der maximalen Anregung und der Emission und der jeweiligen Farbemission
- 3.3 Auflistung der Antikörper, die im Rahmen der FACS Messung zur direkten oder indirekten Markierung der Zellen angewendet wurden. Des Weiteren Aufführung des jeweils zugehörigen Fluorochromtyps und der Färbemethode
- 3.4 Überblick über die beim ELISA-Nachweisverfahren verwendeten Antikörper
- 3.5 Auflistung der im Rahmen der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper
- 3.6 Auflistung der im Rahmen der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper mit Hersteller und Bestellnummer
- 4.1 Überblick über Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht und BMI (dargestellt als arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung) zusammengefasst jeweils für die Patienten der Verumgruppe, der Placebogruppe und die gesamte Studienpopulation.
- 4.2 Überblick über Alter, Größe, Gewicht der Studiengruppe in München sowie über die jeweilige Zuteilung zur Verum- oder Placebogruppe, Erfüllen der Anforderungen des Studienprotokolls über, den Lauf der Studie und einen eventuellen frühzeitigen Abbruch für die einzelnen Patienten (anhand der Screeningnummern).
- 4.3 Überblick über Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht und BMI (dargestellt als arithmetischer Mittelwert) der Studiengruppe in München, dabei je für die gesamte und isoliert für die Verum- und die Placebogruppe.

- 4.4 Überblick über den Ausgangswert der FEV₁ (l), sowie die an den folgenden Visiten ermittelten Werte (und den errechneten p-Wert) für die gesamte Studiengruppe, die Verum- und die Placebogruppe.
- 4.5 Überblick über die Differenz der Entwicklung weiterer spirometrischer Parameter (FEV₁, FEV₁/pnv, FVC/pnv, MEF25 und MEF50) ausgehend von den Ausgangswerten, zwischen der Verum- und der Placebogruppe und das daraus errechnete Ergebnis des Signifikanztests.
- 4.6 Aufführung der Ergebnisse der HPLC Messungen in Sputum für Cystein, Glutamyl-Cystein, Homocystein und Cysteinyl-Glycin im Studienverlauf (V2, V3, V4, V5) für beide Probandengruppen.
- 4.7 Aufführung der Ergebnisse der HPLC Messungen in Blut für Glutathion, Cystein, Glutamyl-Cystein, Homocystein und Cysteinyl-Glycin im Studienverlauf (V2-V5) für beide Probandengruppen.
- 4.8 Tabellarische Darstellung von Gesamtzellzahl, Zellviabilität und differenzielle Zellzählung im Sputum über den Studienverlauf und für beide Probandengruppen im Vergleich
- 4.9 Darstellung der Messergebnisse für Zytokine und Chemokine im Sputum und deren Differenz zwischen beiden Probandengruppen
- 4.10 Auflistung der gemessenen Aktivierungsmarker und deren Oberflächenexpression auf neutrophilen Granulozyten im Sputum und im Blut im Vergleich zwischen den beiden Probandengruppen
- 5.1 Aufführung der unterschiedlichen, im Rahmen der IGOR-Studie angewandten, Untersuchungs- und Analysemethoden, sowie Standort(e) der Durchführung

7.3 Literaturverzeichnis

1. Böhm M, Hallek M, and Schmiegel W, Innere Medizin ELSEVIER; 1-1-2009.
2. Linsdell, P. and Hanrahan, J. W. Glutathione Permeability of CFTR. *Am.J.Physiol* 1998;275(1 Pt 1):C323-C326.
3. Rowe, S. M., Miller, S. A., and Sorscher, E. J. Cystic Fibrosis. *N.Engl.J.Med.* 1-1-2005;352:1992-2001.
4. Boucher, R. C. New Concepts of the Pathogenesis of Cystic Fibrosis Lung Disease. *Eur.Respir.J.* 1-1-2004;23:146-58.
5. Mall, M. A. Role of the Amiloride-Sensitive Epithelial Na⁺ Channel in the Pathogenesis and As a Therapeutic Target for Cystic Fibrosis Lung Disease. *Exp.Physiol* 2009;94(2):171-4.
6. Hartl, D., Latzin, P., Hordijk, P., Marcos, V., Rudolph, C., Woischnik, M., Krauss-Etschmann, S., Koller, B., Reinhardt, D., Roscher, A. A., Roos, D., and Griesse, M. Cleavage of CXCR1 on Neutrophils Disables Bacterial Killing in Cystic Fibrosis Lung Disease. *Nat.Med.* 2007;13(12):1423-30.
7. Teichgraber, V., Ulrich, M., Endlich, N., Riethmuller, J., Wilker, B., Oliveira-Munding, C. C., van Heeckeren, A. M., Barr, M. L., von Kurthy, G., Schmid, K. W., Weller, M., Tummler, B., Lang, F., Grassme, H., Doring, G., and Gulbins, E. Ceramide Accumulation Mediates Inflammation, Cell Death and Infection Susceptibility in Cystic Fibrosis. *Nat.Med.* 2008;14(4):382-91.
8. Livraghi, A., Grubb, B. R., Hudson, E. J., Wilkinson, K. J., Sheehan, J. K., Mall, M. A., O'Neal, W. K., Boucher, R. C., and Randell, S. H. Airway and Lung Pathology Due to Mucosal Surface Dehydration in {Beta}-Epithelial Na⁺ Channel-Overexpressing Mice: Role of TNF- α and IL-4R α Signaling, Influence of Neonatal Development, and Limited Efficacy of Glucocorticoid Treatment. *J.Immunol.* 1-4-2009;182(7):4357-67.
9. Gulbins, E. and Li, P. Physiological and Pathophysiological Aspects of Ceramide. *Am.J.Physiol* 1-1-2006;290:11-26.
10. Sagel, S. D. Noninvasive Biomarkers of Airway Inflammation in Cystic Fibrosis. *Curr.Opin.Pulm.Med.* 2003;9(6):516-21.
11. Sagel, S. D., Chmiel, J. F., and Konstan, M. W. Sputum Biomarkers of Inflammation in Cystic Fibrosis Lung Disease. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 1-1-2007;4:406-17.
12. Bonfield, T. L., Konstan, M. W., and Berger, M. Altered Respiratory Epithelial Cell Cytokine Production in Cystic Fibrosis. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1999;104(1):72-8.
13. Osika E, Cavaillon, J. M., Chadelat, K., Boule M, Fitting, C., Tournier G, and Clement, A. Distinct Sputum Profiles in Cystic Fibrosis an Other Chronic Inflammatory Lung Disease. *Eur.Respir.J.* 1-1-1999;14:339-46.
14. Bonfield, T. L. and Jaci. *Am.J.Pathol.* 1-1-1999.

15. Brennan FM, Maini RN, and Feldmann M. Cytokine Expression in Chronic Inflammatory Disease. *Br.Med.Bull.* 1-1-1995;51:368.
16. Minou Adib-Conquy, Thierry Pedron Anne-France Petit-Betron Olivier Tabary Harriet Corvol Jacky Jacquot Annick Clément Jean-Marc Cavaillon. Neutrophils in Cystic Fibrosis Display a Distinct Gene Expression Pattern. *Biochem.Med.* 9-10-2005.
17. Griese, M., Esl R, Schmidt R, Rietschel, E., Ratjen, F., Ballmann, M., and Paul, K. Pulmonary Surfactant, Lung Function, and Endobronchial Inflammation in Cystic Fibrosis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1-1-2004;170:1000-5.
18. Starosta, V., Rietschel, E., Paul, K., Baumann, U., and Griese, M. Oxidative Changes of Bronchoalveolar Proteins in Cystic Fibrosis. *Chest* 2006;129(2):431-7.
19. Rahman, I., Gilmour, P. S., Jimenez LA, and McNee W. Oxidative Stress and TNF- α Induce Histone Acetylation and NF-KB/AP-1 Activation in Alveolar Epithelial Cells: Potential Mechanism in Gene Transcription in Lung Inflammation. *Mol.Cell Biol.* 1-1-2002;234/235:239-48.
20. Schafer F and Buettner GR. Redox Environment of the Cell As Viewed Through the Redox State of the Glutathione Disulfide / Glutathione Couple. *Free Radic.Biol.Med.* 1-1-2001;30:1191-212.
21. Arrigo AP. Gene Expression and the Thiol Redox State. *Free Radic.Biol.Med.* 1-1-1999;27:936-44.
22. Dickinson, D. A. and Forman, H. J. Glutathione in Defense and Signaling: Lessons From a Small Thiol. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1-1-2002;973:488-504.
23. Rahman, I. Regulation of Glutathione in Inflammation and Chronic Lung Diseases. *Mutat.Res.* 2-2-2005;579:58-80.
24. Cross, C. E., Vliet A, O'Neill, S. J., Louie S, and Halliwell B. Oxidants, Antioxidants and Respiratory Tract Lining Fluids. *Environ Health Perspect* 4-4-1994;102:185-91.
25. Rahman, I. and MacNee, W. Refutation of Redox Glutathione Levels and Gene Transcription in Lung Inflammation: Therapeutic Approaches. *Free Radic.Biol.Med.* 1-1-2000;28:1404-20.
26. Dauletbaev, N., Viel, K., Buhl, R., Wagner, T. O., and Bargon, J. Glutathione and Glutathione Peroxidase in Sputum Samples of Adult Patients With Cystic Fibrosis. *J.Cyst.Fibros.* 2004;3(2):119-24.
27. Beeh, K. M., Beier, J., Koppenhoefer, N., and Buhl, R. Increased Glutathione Disulfide and Nitrosothiols in Sputum Supernatant of Patients With Stable COPD. *Chest* 2004;126(4):1116-22.
28. Mayer-Hamblett, N., Ramsey, B. W., and Kronmal RA. Advancing Outcome Measures of the New Era of Drug Development in Cystic Fibrosis. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 1-1-2007;4:370-7.

29. Gibson, P., Grootendorst, D. C., Henry, R., Pin I., Ryttilä P.H., Wark, P., Wilson, N., and Djukanovic, R. Sputum Induction in Children. *Eur.Respir.J.* 1-6-2002;20:44-6.
30. Mayer-Hamblett, N., Aitken, M. L., Accurso, F. J., Kronmal RA, Konstan, M. W., Burns, J. L., Sagel, S. D., and Ramsey, B. W. Association Between Pulmonary Function and Sputum Biomarkers in Cystic Fibrosis. *American Thoracic Society* 1-1-2007;1-43.
31. Roum, J. H., Buhl, R., McElvaney, N. G., Borok, Z., and Crystal, R. G. Systemic Deficiency of Glutathione in Cystic Fibrosis. *J.Appl.Physiol* 1993;75(6):2419-24.
32. Gao L, Kim, KJ, and Yankaskas, J. R. Abnormal Glutathione Transport in Cystic Fibrosis Airway Epithelia. *Am.J.Physiol* 1-1-1999;277:113-8.
33. Velsor LW, Heeckeren A, and Day, B. J. Antioxidant Imbalance in the Lungs of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Protein Mutant Mice. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 1-1-2001;281:31-8.
34. Kokura S, Wolf RE, Yoshikawa T, Granger DN, and Aw TY. Molecular Mechanisms of Neutrophil-Endothelial Cell Adhesion Induced by Redox Imbalance. *Circ.Res.* 1-1-1999;84:438-43.
35. Roum, J. H., Borok, Z., McElvaney, N. G., Grimes, G. J., Bokser, A. D., Buhl, R., and Crystal, R. G. Glutathione Aerosol Suppresses Lung Epithelial Surface Inflammatory Cell-Derived Oxidants in Cystic Fibrosis. *J.Appl.Physiol* 1999;87(1):438-43.
36. Day, B. J. Glutathione: a Radical Treatment for Cystic Fibrosis Lung Disease? *Chest* 2005;127(1):12-4.
37. Griese, M., Ramakers, J., Krasselt, A., Starosta, V., Van Koningsbruggen, S., Fischer, R., Ratjen, F., Mullinger, B., Huber, R. M., Maier, K., Rietschel, E., and Scheuch, G. Improvement of Alveolar Glutathione and Lung Function but Not Oxidative State in Cystic Fibrosis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1-4-2004;169(7):822-8.
38. Bishop, C., Hudson, V. M., Hilton, S. C., and Wilde, C. A Pilot Study of the Effect of Inhaled Buffered Reduced Glutathione on the Clinical Status of Patients With Cystic Fibrosis. *Chest* 2005;127(1):308-17.
39. Tirouvanziam, R., Conrad, C. K., Bottiglieri, T., Herzenberg, L. A., Moss, R. B., and Herzenberg, L. A. High-Dose Oral N-Acetylcysteine, a Glutathione Prodrug, Modulates Inflammation in Cystic Fibrosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 21-3-2006;103(12):4628-33.
40. Hector, A., Jonas, F., Kappler, M., Feilcke, M., Hartl, D., and Griese, M. Novel Method to Process Cystic Fibrosis Sputum for Determination of Oxidative State. *Respiration* 23-12-2009.
41. Smith, J. A. and Weidemann, M. J. Further Characterization of the Neutrophil Oxidative Burst by Flow Cytometry. *J.Immunol.Methods* 18-6-1993;162(2):261-8.
42. Kamencic, H., Lyon, A., Paterson, P. G., and Juurlink, B. H. Monochlorobimane Fluorometric Method to Measure Tissue Glutathione. *Anal.Biochem.* 1-11-2000;286(1):35-7.

43. Hubeau, C., Lorenzato, M., Couetil, J. P., Hubert, D., Dusser, D., Puchelle, E., and Gaillard, D. Quantitative Analysis of Inflammatory Cells Infiltrating the Cystic Fibrosis Airway Mucosa. *Clin.Exp.Immunol.* 2001;124(1):69-76.
44. Sharrow, S. O. Overview of LFlow Cytometry. *Curr.Protoc.Immunol.* 1-6-1991;5.2.1-5.2.10.
45. Elizur, A., Cannon, C. L., and Ferkol, T. W. Airway Inflammation in Cystic Fibrosis. *Chest* 2008;133(2):489-95.
46. Kim, R. and Meyer, K. C. Therapies for Interstitial Lung Disease: Past, Present and Future. *Ther.Adv.Respir.Dis.* 2008;2(5):319-38.
47. Schluchter, M. D., Konstan, M. W., Drumm, M. L., Yankaskas, J. R., and Knowles, M. R. Classifying Severity of Cystic Fibrosis Lung Disease Using Longitudinal Pulmonary Function Data. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1-10-2006;174(7):780-6.
48. Rahman, I. and MacNee, W. Regulation of Redox Glutathione Levels and Gene Transcription in Lung Inflammation: Therapeutic Approaches. *Free Radic.Biol.Med.* 1-5-2000;28(9):1405-20.
49. Rahman, I. and MacNee, W. Oxidative Stress and Regulation of Glutathione in Lung Inflammation. *Eur.Respir.J.* 2000;16(3):534-54.
50. Cantin, A. M., White, T. B., Cross, C. E., Forman, H. J., Sokol, R. J., and Borowitz, D. Antioxidants in Cystic Fibrosis. Conclusions From the CF Antioxidant Workshop, Bethesda, Maryland, November 11-12, 2003. *Free Radic.Biol.Med.* 1-1-2007;42(1):15-31.
51. Andrew J.Sloane, Robyn A. Lindner Sindhu S. Prasad Lucille T. Sebastian Susanne K. Pedersen Michael Robinson Peter T. Bye Dennis W. Nielson and Jenny L. Harry. Proteomic Analysis of Sputum from Adults and Children with Cystic Fibrosis and from Control Subjects. 1416-1426. *Am J Respir Crit Care Med.* Ref Type: Generic
52. Downey, D. G., Bell, S. C., and Elborn, J. S. Neutrophils in Cystic Fibrosis. *Thorax* 2009;64(1):81-8.
53. Ballatori, N., Krance, S. M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K., and Hammond, C. L. Glutathione Dysregulation and the Etiology and Progression of Human Diseases. *Biol.Chem.* 23-1-2009.
54. Tabary, O., Corvol, H., Boncoeur, E., Chadelat, K., Fitting, C., Cavaillon, J. M., Clement, A., and Jacquot, J. Adherence of Airway Neutrophils and Inflammatory Response Are Increased in CF Airway Epithelial Cell-Neutrophil Interactions. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2006;290(3):L588-L596.
55. Doring, G. The Role of Neutrophil Elastase in Chronic Inflammation. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1994;150:114-7.

56. Taggart, C. C., Greene, C. M., Carroll, T. P., O'Neill, S. J., and McElvaney, N. G. Elastolytic Proteases: Inflammation Resolution and Dysregulation in Chronic Infective Lung Diseases. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2005;171:1070-6.
57. Rahman, I., Mulier, B., Gilmour, P. S., Watchorn, T., Donaldson, K., Jeffery, P. K., and MacNee, W. Oxidant-Mediated Lung Epithelial Cell Tolerance: the Role of Intracellular Glutathione and Nuclear Factor-KappaB. *Biochem.Pharmacol.* 15-9-2001;62(6):787-94.
58. Bonfield, T. L., Panuska, J. R., Konstan, M. W., Hilliard, K. A., Hilliard, J. B., Ghnaim, H., and Berger, M. Inflammatory Cytokines in Cystic Fibrosis Lungs. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1995;152(6 Pt 1):2111-8.
59. Eickmeier, O., Huebner, M., Herrmann, E., Zissler, U., Rosewich, M., Baer, P. C., Buhl, R., Schmitt-Grohe, S., Zielen, S., and Schubert, R. Sputum Biomarker Profiles in Cystic Fibrosis (CF) and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and Association Between Pulmonary Function. *Cytokine* 2010;50(2):152-7.
60. Robinson M., Regnis JA, Bailey DL, King M, Bautovich GJ, and Bye PT. Effect of Hypertonic Saline, Amiloride and Cough on Mucociliar Clearance in Patients Mit Cystic Fibrosis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1-1-1996;153:1503-9.
61. Robinson M., Hemming AL, Regnis JA, Wong AG, Bailey DL, Bautovich GJ, King M, and Bye PT. Effect of Increasing Doses of Hypertonic Saline on Mucociliar Clearance in Patients With Cystic Fibrosis. *Thorax* 11-1-1997;52:900-3.
62. Subbarao P., Balkovec S., Solomon M., and Ratjen, F. Pilot Study of Safety and Tolerability of Inhaled Hypertonic Saline in Infants With Cystic Fibrosis. *Pediatr.Pulmonol.* 9-2-2007;1-6.

7.4 Verwendete Arbeitsprotokolle

7.4.1 Gewinnung und Verarbeitung der Sputumproben (V2, V3, V4, V5)

Gewinnung

Direkt vor der Induktion:

- 1) Inhalation eines β_2 -Sympathomimetikums (2 Hub Salbutamol über Inhalationshilfe)
- 2) Patienten bitten, Speichel in eine Schale o.ä. zu spucken

Inhalation mit 5 ml 0.9 - 5.85 %igem NaCl * mit Pari LC plus / Pari LC Sprint (blauer Einsatz) – Tröpfchengröße $2.9 \mu\text{m}$ - und Pari boy N / SX / Pari Master Compressor – 1.6 bar – für 15 min (nicht länger)

Erste Sputumportion nach ca. 5 min.

2. und 3. Portion nach ca. 10 und ca. 15 min., gegebenenfalls auch zwischendurch.

Jedes Mal Speichel ausspucken lassen, bevor Sputumproben gesammelt werden.

Sollte nur eine kleine Probenmenge vorliegen, hat die Glutathionbestimmung die höchste Priorität!!

Erste Sputumportion



Versand an mikrobiologisches Labor (Visiten 2 und 5)

Bei Visiten 3 und 4 verwerfen

2. bis letzte Sputumportion (letzte nach 15 min)

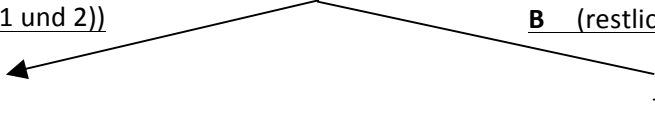
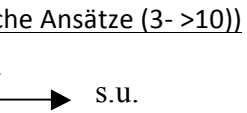



Sofort weiter mit Sputumverarbeitung (Kap. 2)

Bemerkung: Sauerstoffsättigung (SaO_2) aus Sicherheitsgründen monitoren. Lungenauskultation des Patienten binnen 5 min. nach Beendigung der Inhalation. Fällt die SaO_2 um mehr als 5%, Lungenauskultation, Induktion ggf. abbrechen. Inhalation mit einer adäquaten Dosis an β_2 -Sympathomimetikum. Eintrag ins CRF.

* Wenn eine Unverträglichkeit von 5.85 %-iger NaCl-Lösung bekannt ist, bitte eine höchstmögliche Konzentration von 0.9 – 5.85 %-iger NaCl-Lösung verwenden.

Verarbeitung des induzierten Sputums

Gesamte Probenverarbeitung auf Eis !	
Sputumprobe auf eine sterile Petrischale geben	
Einfrieren von nativem Sputum: <u>Oberste Priorität</u> hat die Verarbeitung der Proben für spezielle Analysen. Für die Verarbeitung müssen nach Entnahme des nativen Sputums <u>mindestens 2.0 g</u> zur Verfügung stehen!! Einen Teil entnehmen, in ein vorgewogenes 2.0 ml Eppendorf Hüttchen geben, Gewicht bestimmen (ideal über 1 g), notieren, Hüttchen mit „Screening-Nr, Zentrums-Nr, Studienname, Datum, Visitenr, Sputum nativ“ beschriften und schnellstmöglich bei -70°C lagern.	
Speichel von Sputum Plugs trennen (2 sterilen Pinzetten), einzelne Plugs erzeugen einzelne Plugs (Durchmesser ca. 0.7 mm) in 10 oder mehr vorgewogene 2.0 ml Eppendorf Hüttchen geben	
Wiegen jedes Plugs (bitte notieren) Gewicht sollte mindestens 0.05 g und höchstens 0.20 g betragen (ideal ca. 0.18 g)	
Ansetzen von <u>mindestens</u> 10 Proben Die ersten <u>2</u> Ansätze sofort (A) bearbeiten (Glutathionmessung), dann zügig die restlichen Ansätze (B) (oder immer wieder zwischendurch)	
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <u>A</u> (Ansätze (1 und 2))  </div> <div style="text-align: center;"> <u>B</u> (restliche Ansätze (3- >10))  </div> </div> <div style="text-align: right; margin-top: 10px;">  S.u. </div>	

„A (Ansätze 1 und 2)“:	
Zugabe von 9-facher Menge eisgekühltem D-PBS ⁶ (z.B. 900 µl D-PBS für 0.1 g Sputum)	
Homogenisierung durch Aspiration und Dispension durch eine 18 G Nadel in eine 2 ml Spritze für etwa 20 Mal. (Nicht zu häufig!)	
Filtration zunächst durch 100 µm Zellsieb, anschließend durch 40 µm Zellsieb in ein gemeinsames 50 ml Plastikgefäß (blue cap) (zum Sieben nicht zentrifugieren!).	
Wenn Sieb verstopft neues verwenden.	
Suspension durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren kurz vermischen und auf 1-2 geeignete Zentrifugenröhrchen verteilen mit jeweils 1-1.5 ml. (50 ml Falcon für „restliche Ansätze“ wieder verwenden)	
Zentrifugation bei 280*g, 6°C, 10 min.	
<u>Überstand</u> in Eppendorf Hüttchen pipettieren. <u>Zellpellets</u> in B II „Zellsuspension“ (s. unten) weiterverarbeiten	
Überstand bei 10.000*g, 6°C, 5 min. erneut zentrifugieren.	
Überstände poolen, kurz mischen und auf mindestens zwei Aliquots A I und A II verteilen (wenn möglich jeweils auch mehr) mit je <u>mindestens</u> 180 µl in 1.5 ml Eppendörfer:	
<p style="text-align: center;">A I</p> <p>- pro 180 µl Probe 20 µl 50 %-iges Trichloroacetat (TCA¹) hinzugeben und einige Sekunden vortexen (freies Glutathion) (sofort weiter mit Zentrifugation – nicht A II – Zentrifugation abwarten!!)</p>	<p style="text-align: center;">A II</p> <p>- auf 180 µl Probe 18 µl Butyl-phosphin-Lösung² hinzugeben und einige Sekunden vortexen</p> <p>- 30 min. bei 4°C inkubieren</p> <p>- pro 200 µl des Ansatzes 20 µl 50 %-iges TCA hinzugeben und einige Sekunden vortexen (Gesamt-GSH)</p>

Proben bei 1.500*g, 4°C für 5 min. zentrifugieren – falls im Überstand noch kleine „Bröckchen“ vorhanden, weitere 5 min. zentrifugieren.
Ggf. jeweilige Überstände separat poolen (A I-Pool, A II-Pool), kurz vermischen und je 100 µl in 1.5 ml Eppendörfer pipettieren – wenn möglich jeweils 2 oder mehr Aliquots), mit vorgedruckten Aufklebern labeln und <u>sofort</u> bei -80 °C lagern
<u>„B restliche Ansätze“ (3 bis mindestens, besser mehr als 10):</u>
Zugabe von 9-facher Menge eisgekühltem D-PBS (z.B. 900 µl D-PBS für 0.1 g Sputum)
Homogenisierung durch Aspiration und Dispension durch eine 18 G Nadel in eine 2 ml Spritze für etwa 20 Mal. (Nicht zu häufig!)
Filtration zunächst durch 100 µm Zellsieb, anschließend durch 40 µm Zellsieb in ein gemeinsames 50 ml Plastikgefäß (zum Sieben nicht zentrifugieren!). Wenn Sieb verstopft neues verwenden.
Vermischen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren und verteilen auf Aliquots à 1.0-1.5 ml in 1.5 ml Eppendörfer
Zentrifugation bei 280*g, 6°C für 10 min.
<u>Überstände: B I</u> vorsichtig in das 50 ml Falconröhrchen, das zuvor für das 40 µm Sieb verwendet wurde, pipettieren, durch auf- und abpipettieren vermischen und 1.5-2 ml in 2 ml Eppendörfer umfüllen (weiter mit B I – Überstand) <u>Pellets: B II</u> Pellets die die Zellsuspension enthalten (zusammen mit den Zellpellets aus A) auf Eis belassen bis mit B II – Zellsuspension fortgefahren werden kann
<div style="text-align: center;"> <p style="margin: 0;"> <u>B I</u> <u>B II</u> </p> <p style="margin: 0;">90</p> </div>

<u>Überstand</u>	<u>Zellsuspension</u> (Zellpellets aus A und B verwenden!!)
Zentrifugation bei 10.000*g und 6°C für 5 min.	Resuspension der Zellpellets mit 200µl D-PBS je Ansatz Alle resuspendierten Ansätze <u>in einem Gefäß</u> sammeln
Überstände vorsichtig abpipettieren, poolen, kurz mischen und auf Aliquots mit unten genannten Volumina in Eppendörfern verteilen. Zellpellets der 10.000*g Zentrifugation können verworfen werden.	Gesamtzellzahl und Zytopsin: Zählung der Zellen (Kap. 3) und Verdünnung auf eine Zellzahl von $0.1 \cdot 10^6$ cells / ml 6 Zytopsin-Objektträger (Kap. 4) Viabilitätstestung mit Trypan-blau-Methode
	Verdünnung der anderen Proben auf 10^6 Zellen / ml. Zellsuspension kurz mischen und auf Aliquots mit unten genannten Volumina in Eppendörfern verteilen. Das restliche Probenmaterial auf Eis lagern bis FACS-Analyse, oder falls diese nicht erfolgt, weitere Aliquots B II)
<p align="center"><u>Alle Reaktionsgefäße werden beschriftet mit:</u></p> <p>Screening-Nr, Zentrums-Nr, Studienname, Probenart, Datum, Visitenr, Zusatz</p> <p>z.B. Screening-No 0101, Centre No 01, Sputum Supern., Date:01.04.2007, V2, „native“</p>	

Aliquots wie folgt verarbeiten und mit vorgedruckten Aufklebern labeln (sh. nächste Seite):

<u>B I Überstand</u>			<u>B II Zellsuspension</u>		
<u>B I - native</u>	<u>B I – PI³</u>	<u>B I - HClO₄⁴</u>	<u>B II - PI</u>	<u>B II - native</u>	<u>B II – TRIzol⁵</u>
- 2 x 500µl	- 1 x 980µl - 8 x 490µl	- 2 x 500µl	- 2 x 490µl	- 1 x 500µl	- 2 x 500 µl
	pro 490µl Probe 10µl PI	pro 500µl Probe 125µl 0.4 N HClO ₄	pro 490µl Probe 10µl PI		pro 500µl Probe 1.5ml TRIzol
Gewicht des übrigen Sputums bestimmen und notieren.					

Sofortige Lagerung aller Aliquots bei -70 °C. Versand sh. Laboranweisung

Prioritätenfolge der Proben:

<u>Überstand:</u>	1)	Glutathionbestimmung	a) 50 % TCA (mind. 100 µl) b) 50 % TCA/Butylphosphin (mind. 100 µl)
	2)	Elastase Aktivität	

		(nativ – 500 µl)	
	3)	Inflammatorische Marker und oxid. Stress (PI 980 µl, nativ 500µl, PI 8 x 490 µl)	
	4)	Redox – Rest (HClO ₄ – 2 x 500 µl)	
<u>Zellsuspension:</u>	Wie in Tabelle oben von links nach rechts (PI – native – TRIzol)		

Reagenzien:

¹ TCA: Hat jedes Zentrum selbst (Herstellung sh. unten - bei 4°C aufbewahren).
² Butylphosphin: Hat jedes Zentrum selbst (Herstellung sh. unten - bei 4°C aufbewahren).
³ PI (Protease Inhibitor): Wird in Eppendörfern vorgefüllt an Zentren versandt (bei – 70°C aufbewahren).
⁴ HClO ₄ (Perchlorsäure): Hat jedes Zentrum selbst (Sigma-Aldrich, Best-Nr. 34288 – 1 M auf 0.4 M verdünnen - bei 4°C aufbewahren).
⁵ TRIzol LS Reagent: Wird in Eppendörfern vorgefüllt an Zentren versandt (bei 4°C aufbewahren).
⁶ D-PBS: Dulbecco's PBS (PAA Laboratories GmbH – Best.Nr. H15-002)

Herstellung der 50%-igen TCA-Lösung:
50g TCA (Merck – Best.Nr. 100807) und 186.12 mg EDTA (Merck – Best.Nr. 8418) in 100 ml Aqua ad iniectabilia lösen. Lösung bei 4°C aufbewahren.
Herstellung der Butylphosphin-Lösung
<u>Vorsicht:</u> Tributylphosphin ist ein leicht entflammbares und ätzendes Material!!
Bitte nur unter einem Abzug / Flow arbeiten.
10 ml Tributylphosphin (Sigma-Aldrich – Best.Nr. 247049) und 90 ml Dimethylformid (DMF) (Merck – Best.Nr. 1.03053.100)

Gesamtzellzahl (TCC):

Pipettieren von 10 µl der Zellsuspension in eine Neubauer Zählkammer
2-malige Zählung der Zellen in 4 großen Quadranten
Wenn die Differenz der beiden Zählungen > +/- 20 % beträgt, ein 3. Mal zählen
Bestimmung des Mittelwertes aller Zählungen
Berechnung des Volumens für Zytospin: DCC Volumen (ml) = $180.000 / \text{TCC} * \text{Endvolumen (ml)}$ Beispiel: $\text{TCC} = 210 \text{ Zellen (in 4 großen Quadranten)} * 2.5 \text{ (Neubauer-Faktor)} = 525 \text{ Zellen} / \mu\text{l} = 525.000 \text{ Zellen} / \text{ml}$

$100.000 / 525.000 \text{ Zellen} * 1.8 \text{ ml (Endvolumen)} = 0.343 \text{ ml}$

0.343 ml Suspension in ein 2 ml Eppendorf Hüttchen pipettieren und auf 1.8 ml mit D-PBS auffüllen.

Differenzial Zellzahl (DCC) mit dem Zytospin:

6 Slides für Zytospin mit Polylysin-beschichteten Slides

Pipettieren von 300µl der verdünnten Resuspensionsprobe pro Zytospinslide

Zentrifugation der Slides mit 800 U/min (Shandon Zentrifuge) bzw. 72*g für 5 min. und lufttrocknen für mind. 2 Std. Beschriftung mit Bleistift wie folgt:

2 Slides mit Pappenheim (May-Grünwald – Giemsa) färben – Beschriftung: Pat. ID, Datum, Visitennr. und “PAP” (z.B. 1-100, 1.4.07, V2, “PAP”)

15 min in May-Grünwald-Lösung, mit Aqua a.i. waschen und lufttrocknen

5 min in Giemsa-Lösung, mit Aqua a.i. waschen und lufttrocknen

2 Slides mit Methanol fixieren – Beschriftung mit Center ID, Pat. ID, Datum, Visitennr. und “Methanol” (z.B. 1-100, 1.4.07, V2, “Methanol”)

10 min in Methanol, mit Aqua a.i. waschen und lufttrocknen

Restliche Slides mit Pat. ID, Datum, Visitennr. und “native” beschriften (z.B. 1-100, 1.4.07, V2, “native”)

7.4.2 Aufbereitung der Blutproben (V2 und V5)

Gesamte Probenverarbeitung auf Eis !

1 * EDTA-Blut 2,7ml

1 * EDTA-Blut 1,7ml

1 * Serum-Blut 1,7ml

Zentrifuge: 280*g, 6°C, 10 min	mit beschrifteten Aufkleber versehen und bei -70°C lagern	Zentrifuge: 3.000*g, 10 min
Überstand vorsichtig in 1,5ml Eppendorf-Hütchen pipettieren, mischen durch ein paar Mal auf- und abpipettieren		Überstand vorsichtig in 1,5ml Eppendorf-Hütchen pipettieren, mit beschrifteten Aufkleber versehen und bei - 70°C lagern
Ab hier Fortsetzung für EDTA-Blut 2,7 ml		
<u>Überstand:</u>		<u>Zellsuspension:</u>
Zentrifuge: 10.000*g, 6°C, 5 min		gleiches Volumen D(ulbecco's)-PBS hinzugeben, durch hin- und herschwenken vermischen
Überstand vorsichtig in 1,5ml Eppendorf- Hütchen pipettieren, mischen durch ein paar Mal auf- und abpipettieren		500µl in ein 1,5ml Eppendorf-Hütchen pipettieren, mit Studienaufkleber versehen („nativ“) und bei -70°C lagern
jeweils 180µl auf mit TCA (Trichloroacetat) und Bu(tylphosphin)+TCA beschriftete 1,5ml Eppendorf-Hütchen verteilen		jeweils 500µl in zwei 2ml Eppendorf- Hütchen pipettieren, TRIzol hinzugeben, etwa 10 sek lang heftig schütteln, mit Studienaufkleber versehen („TRIzol“) und bei -70°C lagern
<u>TCA:</u>	<u>Bu + TCA:</u>	restliches Material (etwa 1,2 ml) zur FACS- Analyse verwenden (nur FACS-Zentren)
Bitte <u>zuerst</u> mit den ersten beiden Schritten für diese Probe beginnen, dann parallel weiterarbeiten	jeweils 18µl Butylphosphin hinzugeben, kurz vortexen und für 30 min bei 4°C inkubieren lassen	

jeweils 20 µl 50 %-ige TCA-Lösung hinzugeben und sofort für 3-5 Sekunden vortexen	
Zentrifuge: 1.500*g, 6°C, 10 min.	
Überstände vorsichtig abpipettieren, in einem 1,5ml Eppendorf-Hütchen poolen und mischen durch ein paar Mal auf- und abpipettieren	
Jeweils 100 µl auf 1,5ml Eppendorf-Hütchen verteilen, mit Studienaufklebern versehen und bei -70°C lagern	
<p><u>Alle Reaktionsgefäße werden beschriftet mit:</u></p> <p>Screening-Nr, Zentrums-Nr, Studienname, Probenart, Datum, Visitenr, Zusatz</p> <p>z.B. Screening-No 0101, Centre No 01, Blood Supern., Date:01.04.2007, V2, „TCA added“</p>	

Sofortige Lagerung aller Aliquots bei -70 °C. Versand siehe Appendix des SOP

7.4.3 Durchflusszytometrie

Färbeprotokoll

<u>Materialien:</u>
➤ Blut:
○ Patienten: EDTA Blut (je 2ml)
➤ Sputum:
○ Möglichst wenig verdünnen – die Zellsuspension eher aufteilen in FACS-Anteil und Proben- (Aliquot) Anteil und letzteres aber nur soweit verdünnen, dass mind. 10 ⁶ Zellen / ml gewährleistet sind.
○ WENN WENIG MATERIAL VORHANDEN, HAT IN UNSEREM

ZENTRUM DIE FACS-ANALYSE VORRANG!!	
➤	Antikörper (nur vorverdünnte verwenden / Box FACS Stammlösung im Kühlraum, wenn leer: die meisten Aks mit PBS 1:4 verdünnen (sh. Word Dokument „Marker FACS“), Bescheid geben, wenn bald leer!)
➤	Eppendorf Cups: 1,5
➤	Pipetten: gelbe und blaue + gelbe und blaue Spitzen (neue im Wandschrank, Schlüssel bei Andrea)
➤	Eppendorf Cup Ständer
➤	Dulbecco's PBS (im Schrank KO.12, rechts oben am Fenster - PAA laboratories GmbH Artikel-Nr. H15-002)
➤	Ammoniumchlorid Puffer (im Kühlraum lagern!)
	155 mM NH ₄ Cl (8.29 g) (Sigma Kat.Nr. 326372)
	10 mM KHCO ₃ (1 g) (Merck Kat.Nr. 1.04854.0500)
	0.1 mM EDTA (0.029 g) (Amersham Biosciences Kat.Nr. 17-1324-01)
	In 950 ml Aqua a.i. aufnehmen und pH auf 7.5 einstellen. Mit Aqua a.i. auf 1 l auffüllen.
➤	Intraprep Kit: Aki sagen wenn bald leer!

Färbe-Prozedur:

Sputum	Blut
sie oben	Zentrifugiertes EDTA-Blut mit 1 ml PBS verdünnen.
je 100 µl Sputum in 1.5 ml Eppendorf Cups	je 50 µl EDTA-Blut in 1.5 ml Eppendorf Cups
Antikörper vortexen und je 10µl in jedes Eppi zugeben	
3s vortex	

15 Minuten unter Lichtausschluss (in Schublade) inkubieren lassen	
100 µl Reagens 1 (5.5 % Formaldehyd) zugeben	
3s vortex	
15 Minuten unter Lichtausschluss (in Schublade) inkubieren lassen	
1ml PBS zugeben und Probengestell hin- und herschwanken	
10 Minuten zentrifugieren bei 300 rcf	
Überstände vorsichtig abnehmen!	
Bei intrazellulären Marker : sh. 5 Zeilen unten! (Bislang noch keine)	
Zellpellets mit 300 µl PBS resuspendieren	Zellpellets mit 500 µl Ammoniumchloridpuffer resuspendieren
mindestens 20 min auf Eis / im Kühlschrank inkubieren	
erst FACSen, wenn die Proben durchsichtig sind	
<u>Intrazelluläre Marker:</u>	
100 µl Reagenz 2 hinzugeben	
leicht mit Hand schütteln	
Antikörper vortexen und weitere 10 µl hinzugeben	
3s vortex	
15 Minuten unter Lichtausschluss (in Schublade) inkubieren lassen	
1ml PBS zugeben und Probengestell hin- und herschwanken	
10 Minuten zentrifugieren bei 300 rcf	
Überstände vorsichtig abnehmen!	

Zellpellets mit 300 µl PBS resuspendieren	Zellpellets mit 500 µl Ammoniumchloridpuffer resuspendieren
mindestens 20 min auf Eis / im Kühlschrank inkubieren	
erst FACSen, wenn die Proben durchsichtig sind	

7.4.4 Slot-Blot zur Messung von Protein-Carbonylierung

Reagenzien

Trichloroazetat
Methanol
2 N HCl
BSA
Tris
Tween 20
fettfreie Milch
EDTA
NaOH
BSA (Standard)
NaBH ₄
2,4-dinitrophenylhydrazine (Sigma 42210)
Anti-2,4-Dinitrophenol Antikörper (Sigma D8406)
Chemilumineszenz-Lösung
H ₂ O ₂
FeSO ₄

Geräte und Verbrauchsmaterial:
Slot-Blotter
Blotting paper
PVDF (Polyvenyidin Difluorid) – Membran
Ansetzen der Lösungen
50 % -iges Trichloroazetat (TCA):
50 g TCA in 100 ml Aqua a.i. lösen
TE-NaOH-Puffer:
85,7 mM Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
0,857 mM EDTA
20 mM NaOH
pH 8,5
TE-NaOH-NaBH ₄ -Puffer:
20 mM NaBH ₄ in TE-NaOH-Puffer
TBS-Puffer:
20 mM Tris-Base
500 mM NaCl
pH 7,4
Block-Medium:
TBS
5 % Milch (w/v)
Antikörper-Verdünnungsmedium:
TBS-Puffer
5% Milch (w/v)
1 % Tween 20 (v/v)
Waschmedium:
TBS
0,05 % Tween 20 (v/v)
DNPH-Lösung:
100 µg / ml DNPH

2 N HCl
Anti-DNPH-Antikörper:
Verdünnung in Verdünnungsmedium (s.o.) - 1:10.000 Verdünnung
Sekundärer Antikörper:
Rabbit anti-mouse HRP-konjugierter IgE Antikörper 1:2.000 Verdünnung
BSA-Standardlösung:
1 mg / ml (für 5 ml also 5 mg) BSA in 20 mM Tris, pH 7,4
Maximal oxidiertes BSA:
Cave: da maximal reduziertes BSA ähnlich angesetzt wird, gleich zwei 2 ml Eppis ansetzen
BSA-Standardlösung mit
1 mM H ₂ O ₂ (68 µl in 2 ml) und 1 mM FeSO ₄ (0,56 mg in 2 ml)
10 min bei Raumtemperatur inkubieren
Zentrifugation bei 1'000*g für 10 min (RT)
Überstand verwerfen und Pellet 3-mal mit 50 %-igem TCA waschen
Pellet mit 1 ml TE-NaOH-Puffer resuspendieren und auf Eis lagern
Maximal reduziertes BSA:
wie zuvor BSA-Standardlösung mit
1 mM H ₂ O ₂ (68 µl in 2 ml) und 1 mM FeSO ₄ (0,56 mg in 2 ml)
10 min bei Raumtemperatur inkubieren
Zentrifugation bei 1'000*g für 10 min (RT)
Überstand verwerfen und Pellet 3-mal mit 50 %-igem TCA waschen
Pellet mit 1 ml TE-NaOH-BNaH ₄ -Puffer resuspendieren und für 30 min bei 37 °C inkubieren
BSA-Standardreihe (auf Eis ansetzen):
Proteinmenge in maximal oxidiertes BSA (oxmax BSA) und maximal reduziertes BSA (redmax BSA) nach Bradford bestimmen und auf 50 µg / ml einstellen.

Verdünnungsreihe:

Standardprobe	oxmax BSA (µl)	redmax BSA (µl)
1	100	0
2	75	25
3	62,5	37,5
4	50	50
5	37,5	62,5
6	25	75
7	12,5	87,5
8	0	100

Durchführung:

Überstände / Zellsuspension mit Proteaseinhibitor langsam auftauen	
Vortexen und auf 2 Aliquots aufteilen	
50%iges TCA im Verhältnis Probe:TCA=3,5:1 hinzugeben (z.B. 500 µl Probe und 200 µl 50 %iges TCA) und vortexen	
Bei 1,500*g, 4°C über 5 min zentrifugieren	
Proteinpellet 3mal mit je 500 µl TCA waschen (Pellet resuspendieren, bei 1,500*g, 4°C über 5 min zentrifugieren)	
Mit 1 ml TE-NaOH-Puffer aufnehmen (für Messung)	Mit 1 ml TE-NaOH-NaBH ₄ -Puffer aufnehmen (als blanked sample)
Auf Eis lagern	30 min bei 37°C inkubieren
Proteinkonzentration nach Bradford-Methode messen	
Verdünnung der Probe mit TE-NaOH-Puffer auf 50 µg/ml Proteinkonzentration	Verdünnung der Probe mit TE-NaOH-NaBH ₄ -Puffer auf 50 µg/ml Proteinkonzentration
Auf Eis lagern bis zur Analyse	
PDVF Membranen vorbereiten Membran in 100%igem MeOH tauchen Membran für 5 min in 20% MeOH / 80% TBS einlegen 3 Lagen Blottingpapier in TBS tauchen Membran und die 3 Lagen im Slot-Blotter platzieren	
100 µl (entspricht 5 µg Protein) der verdünnten Proben in je ein Slot pipettieren	
20 min inkubieren lassen (? evtl. sofort vakuum)	
Vakuum einschalten und die Flüssigkeit auf der Membran gerade so abziehen lassen - keine der Slots soll trocknen!	
Membran aus der Apparatur nehmen und für 1 min in 100% MeOH einlegen (für Inkubations- und Waschprozesse immer den Schüttler benutzen)	
für 5 min in 20% MeOH - 80% TBS einlegen (Schüttler)	

für 5 min in 2 N HCl einlegen (Schüttler)
für genau 5 min in DNPH-Lösung (100 µg / ml) inkubieren lassen (Schüttler)
3mal für je 5 min in 2 N HCl waschen (Schüttler)
7mal für je 5 min in 100 % MeOH waschen (Schüttler)
Für 5 min in TBS inkubieren lassen (Schüttler)
Für 1 h in Blockmedium einlegen (Schüttler)
3 mal für je 5 min im Waschmedium waschen (Schüttler)
Für 18 h bei 4°C mit Anti-DNPH-Antikörper in Verdünnungsmedium inkubieren lassen (Schüttler im Kühlraum)
6mal für je 5 min mit Verdünnungsmedium waschen (Schüttler)
1mal für 5 min mit Waschmedium waschen (Schüttler)
Für 2 h bei RT mit sekundärem Antikörper in Verdünnungsmedium inkubieren lassen
6mal für je 5 min mit Verdünnungsmedium waschen (Schüttler)
1mal für 5 min mit Waschmedium waschen (Schüttler)
Membran auf zugeschnittener Polyethylenfolie platzieren
Für 1 min mit 3 ml Chemilumineszenzlösung bedecken
Polyethylenfolie über die Membran legen und überschüssige Lösung mit einem Papiertuch aufsaugen
In Filmkassette legen
Für 30 sek belichten und Negativ entwickeln
Blot einscannen und auswerten

Quelle: Robinson et al, Analytical Chemistry 1999

7.4.5 Methode: freie Elastase im Sputum

Standardreihe:

8; 4; 2; 1; 0,5; 0,2; 0,125µg/ml : 250µl von der 0,25µg/ml Elastase+250µl 0,1%BSA/D-PBS

Probanden und Positiv Kontrolle:

Positiv Kontrolle wird zu je 40µl aliquotiert. Verdünnungsreihe: 1:5: 40µl Kontrolle+160µl 0,1%BSA/D-PBS, 100µl in Well A 1:10, 1:20: 50µl 0,1%BSA/D-PBS in Well B und C vorpipettieren, 50µl von Well A in Well B überpipettieren, mischen, 50µl von Well B in Well C überpipettieren, mischen, 50µl verwerfen.

Standardreihe ansetzen
<p>Proband = Sputum Überstand ohne Inhibitor</p> <p>Reihe A: 50µl unverdünnte Probe Reihe B: 100µl von der 1:5 Verdünnung (50µl Probe+200µl 0,1%BSA/D-PBS) Reihe C-G: 50µl 0,1%BSA/D-PBS vor pipettieren</p>
Von B 50µl überpipettieren in C, mischen, von C 50µl überpipettieren in D, usw. . . Von G 50µl verwerfen.
II. Substrat Je 50µl Substrat dazugeben und sofort im Photometer bei 405nm 10 min. Kinetisch messen.
Puffer, spezielle Chemikalien, Standard, Material:
<ul style="list-style-type: none"> • Aqua ad injectabilia (Braun, Melsungen, Deutschland)
<ul style="list-style-type: none"> • Substrat Me-Suc-Al-Al-Pro-Val-pNa, Sigma M 4765, MW=590,06g/mol
<ul style="list-style-type: none"> • Kochsalz, Fluka 71379
<ul style="list-style-type: none"> • Tris, Pharmacia Biotech 17-1321-01
<ul style="list-style-type: none"> • Bovine Serum Albumin (BSA) Fraktion V freie Elastase im Sputum.doc
<input type="checkbox"/> Standard Elastase, EPC SE 563, Lot 84516, 0,1 mg Inhalt: Standard wird in 714 µl 0,1% BSA/D-PBS aufgelöst, c = 140µg/ml Aliquotieren zu je 35 µl (-70°C)
<input type="checkbox"/> Mikrotiterplatten, Greiner Bio-one, Non sterile, 96 Well
D – PBS, Gibco 14190-094 0,1% BSA/D-PBS: 100mg in 100ml D-PBS DMSO, Sigma D-8779 Tris/NaCl Substrat Lösung:
0,2Mol Tris: 2,42g/100ml A.d. 1,0Mol NaCl: 5,84g/100ml A.d. pH:7,5
Substrat Lösung 2,0mmol 5,906 mg Substrat + 50µl DMSO (zum Lösen des Substrates) + 4950µl Tris/NaCl Substratlösung. Nach Ansetzen im Dunkeln bis zum baldmöglichsten Gebrauch aufbewahren.

Quelle: Jay B. Hilliard, Michael W. Konstan, Pamela B. Davis

7.4.6 Bioplex

Kurzanleitung

nach Kapitel	Vorbereitung
--------------	--------------

3	1. Planen des Designs der Platten
1	2. Aufwärmen des Bio-Plex Systems (bis zu 30 min), währenddessen das Reagens auf Raumtemperatur äquilibrieren; dann Proben auftauen
2	3. Primen der Waschstation oder Kalibrieren der Vakuumdüse
1	4. Kalibrieren des Systems (jetzt oder später, während der Inkubation)
4	<p>5. Wiederherstellen einer einzelnen Ampulle des Standards in 500 µl des passenden Verdünners, vortexen und für 30 min auf Eis inkubieren. Für Serum- und Blutproben nutzt man den Bio-Plex Standart Verdünner* Für den Überstand der Zellkultur nutzt man das entsprechend Kulturmedium</p> <ul style="list-style-type: none"> • Für lavage, sputum, oder andere Flüssigkeiten, nutzt man einen, der Probe ähnlichen Puffer
	<p>6. Vorbereiten der 8-Punkte-Standart-Verdünnungs-Reihe und der Blindprobe</p> <ul style="list-style-type: none"> • Zufügen von 72 µl Verdünner zu tube S1, and 150 µl zu tubes S2-8 und der Blindprobe • Transferieren von 128 µl wiederhergestelltem Standard in S1 • Dann fortlaufende Verdünnung (4-fach) von S1 t bis S8 indem man jeweils 50 µl auf entsprechende tubes transferiert. Vor dem Transferieren jeweils vortexen.
5	<p>7. Die aufgetaute Probe auf einmal verarbeiten</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aktivieren der TGF-b Proben durch Zufügen einer Einheit 1 N HCl zu 5 Einheiten der Probe (z.B. 5 µl zu 25 µl Probe). Vortexen und bei Raumtemperatur für 10 min inkubieren. Neutralisieren indem man die gleiche Menge beifügt (5 µl) • Verdünnen von Serum, Plasma und Lysat im Bio-Plex Dilute Roben Verdünner • Verdünnen von Zellkultur Überstand in Kulturmedium ** • Verdünnen von Lavage, Sputum, oder anderen Flüssigkeiten in einem der Probe ähnlichem Puffer **
6	8. Vorbereiten von 1x coupled beads in Assay Puffer und vor Licht schützen

	<ul style="list-style-type: none"> • von 10x stock: Zufügen von 575 µl beads to 5,175 µl Puffer • von 20x stock: Zufügen von 288 µl beads to 5,472 µl Puffer
	9. Kontrollieren dass Proben und Standart Raumtemperatur haben bevor sie verteilt werden

* In Kapitel 4 nachschlagen um Anweisungen für das Vorbereiten von passendem Standart Verdünner für TGF- β Assays zu erhalten, wenn running Serum oder Plasma Roben verwendet werden.

** Darauf achten, dass ein Protein Carrier, wie BSA, bis zu einer Konzentration 0.5% zu Lavage, Sputum und Serum-freien Kulturmedium- Proben beigefügt wird, wie in Kapitel 5 beschrieben. Proben und Standards sollten im selben Medium wiederhergestellt und/oder verdünnt werden.

nach Kapitel	Ablauf des Assay
7	1. Anfeuchten der Filter Platte mit 100 µl Assay Puffer
	2. Zufügen von 50 µl of 1x beads zur Assay Platte
	3. 2x mit 100 µl Wasch Puffer waschen
	4. 50 µl Probe, Standart, Blindprobe und Kontrolle zufügen
	5. Abdecken und im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren (300 RPM)
	<ul style="list-style-type: none"> • 30 min für Human Group I,II and Mouse Group I,II • 1 hour für Mouse Group III and Rat Group I • 2 hours für TGF-β <p>In den letzten 10 min 1x Detection Ab in detection Antikörper Verdünner vorbereiten</p> <ul style="list-style-type: none"> • 10x stock: 300 µl Ab zu 2,700 µl Verdünner hinzufügen • 20x stock: 150 µl Ab zu 2,850 µl Verdünner hinzufügen

	6. 3x mit 100 µl Wasch Puffer waschen
	7. 25 µl detection Antikörper hinzufügen
	8. Abdecken und wieder im Dunkeln bei Raumtemperatur (bei 300 RPM) inkubieren <ul style="list-style-type: none"> • 30 min - Human Group I,II; Mouse Group I,II,III; and Rat Group I • 1 Stunde - TGF-b
8	Währenddessen e, Software Protokoll vorbereiten; normalisierte Standard S1 Werte eingeben
7	In den letzten 10 min 1x SA-PE in Assay Puffer vorbereiten 100x stock: 60 µl SA-PE tzu 5,940 µl Assay Puffer Hinzufügen Vor Licht schützen
	9. 3x mit 100 µl Wasch Puffer waschen
	10. 50 µl Streptavidin-PE hinzufügen
	11. Abdecken und bei Raumtemperatur inkubieren (300 RPM) <ul style="list-style-type: none"> • 10 min für Human Group I,II; Mouse Group I,II,III; and Rat Group I • 30 min für TGF-b
	12. 3x mit 100 µl Wash Puffer waschen
8	13. Beads in 125 µl assay Puffer resuspendieren, bei 1100 RPM für 30 sec schütteln
	14. Platte lesen <ul style="list-style-type: none"> • Low PMT (Low RP1) für Human group I,II; Mouse group I,II,III and TGF-b

	<ul style="list-style-type: none"> • High PMT (High RP1) für Rat group I
--	---

Quelle: Bio-Plex Pro™ Assays Cytokine, Chemokine, and Growth Factors Instruction

Manual von Bio-Rad Laboratorie

7.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Matthias Grieser für die Überlassung des Themas, für die Betreuung meiner Labortätigkeiten und für die Unterstützung bei der Ausarbeitung der Dissertation. Seine offene Art schuf ein produktives und freundliches Arbeitsklima.

Herrn Dr. med. Andreas Hector bin ich zu besonders tiefem Dank verpflichtet, da er mich von Beginn an sorgfältig und umfassend in die Methodik meiner Doktorarbeit einführte und mir über den ganzen Zeitraum, sowohl bei der Vorbereitung und praktischen Durchführung der Experimente, als auch bei der wissenschaftlichen Ausarbeitung und Fertigstellung der Arbeit, hilfsbereit und engagiert zur Seite stand.

Dem ehemaligen Direktor des Dr. von Haunerschen Kinderspitals Herrn Prof. Dr. med. D. Reinhardt und dem jetzigen Direktor Prof. Dr. med. C. Klein gilt mein Dank für die Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit in den Laboratorien des Forschungszentrums Kubus des Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität zu München.

Des Weiteren möchte ich mich bei den medizintechnischen Assistentinnen und meinen Mitdokterandinnen und Mitdokteranden des Laboratoriums des Forschungszentrums bedanken, die mich in viele Arbeitstechniken einführten und bei der weiteren Durchführung stets hilfreich unterstützten.

Auch meinen Eltern, Geschwistern und besonders meinem Freund gilt mein Dank für die Unterstützung und Motivation über die gesamte Dauer der Erstellung und Ausarbeitung meiner Dissertation.